

基于线粒体 *cox1* 片段序列胶州湾浮游动物 物种组成分析*

王仁诚^{1,2} 王敏晓¹ 程方平^{1,2} 李超伦¹ 孙松^{1,3}

(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 青岛 266071; 2. 中国科学院研究生院 北京 100049;
3. 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)

提要 基于 *cox1* 片段序列的 DNA 条形码为浮游动物种类鉴定提供了新的可靠手段, 构建了胶州湾网采浮游动物 DNA 条形码文库, 在国内首次使用宏遗传组学方法研究夏季胶州湾海洋浮游动物的群落组成。共获得环境样品 DNA 条形码 149 条; 以 6% 为阈值共检出 37 个 OUT, 其中 19 个与 DNA 条形码数据库中序列程度非常高 (>97%), 可以鉴定到种。基于形态的镜检分析共观测到浮游动物 31 种/类, 低于基于 DNA 条形码的分析结果。全生活史阶段的浮游动物种类鉴定是 DNA 条形码相对于传统形态分类的最大优势, 基于 DNA 条形码的分析成功鉴定出日本躄、太平洋牡蛎等无脊椎动物的浮游幼体。研究结果表明, 通过构建环境样品的 *cox1* 序列文库, 可以实现海区浮游动物物种丰度和群落组成情况的快速评估。

关键词 浮游动物, *cox1* 基因, DNA 条形码, 群落, 环境

中图分类号 Q958

海洋浮游动物是指自主游泳能力较弱, 主要行随波漂流运动方式的海洋动物(郑重等, 1984)。它们虽然个体普遍较小, 但是数量众多, 是海洋生态系统中次级生产力的主要贡献者。浮游动物承上启下, 处于海洋生态系统物流、能流通路的中间环节, 在海洋生态系统中起到重要的调控作用; 同时, 作为仔幼鱼的重要饵料, 浮游动物数量、结构的变化直接影响渔业资源的产出(Harris *et al.*, 2000)。浮游动物具有生活史短, 代谢活动强烈, 随波逐流分布广泛等特点, 因此该类群对于海洋环境的扰动非常敏感。它们犹如放大器一般, 其群落结构的演替可以准确反馈海区乃至全球气候的细微变化(Hays *et al.*, 2005)。浮游动物作为重要指标, 已经广泛应用于多个海区生态系统环境长期变化的研究中(Planque *et al.*, 1998; Beaugrand, 2009; 李强等, 2010)。

胶州湾位于黄海西岸, 是一个暖温带半封闭的海湾, 沿岸一带工业、农业、养殖、港口发达, 受自然环境和人类活动的双重影响。该海湾已被作为研究人类活动以及气候变化对近海生态系统影响的模型, 开展了大量的工作(李开枝等, 2007; 王勇等, 2002; 吴玉霖等, 2004)。浮游动物的长期观测对于理解胶州湾生态系统的演替意义重大, 但已有胶州湾浮游动物研究的报道多集中在周年尺度的观测(孙松等, 2008; 王倩等, 2010)。由于浮游动物种类繁多、数量巨大, 如何准确、快速地进行种类鉴定和长期评估始终是一个难题。浮游动物种类鉴定要求的专业技术性强, 而且费时、费力, 致使其数据结果严重滞后于其它学科, 无法满足现代海洋科学研究强调的多学科综合分析、快速检测、数据交换比对等需求。

线粒体编码的细胞色素氧化酶第一亚基(*cox1*)

* 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。王仁诚, E-mail: wrcredfox@gmail.com

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

700bp 的片段序列现已广泛应用于后生动物种类鉴定的工作中(Hebert *et al.*, 2003a; Frezal *et al.*, 2008), 该 DNA 条形码在浮游动物种类鉴定中的有效性也已得到证明(Bucklin *et al.*, 2010a; Jennings *et al.*, 2010b), “我国近海浮游动物物种信息提取与应用示范研究”项目前期构建的胶州湾浮游动物 DNA 条形码数据库也为基于分子生物学技术的胶州湾浮游动物物种组成监测奠定了基础(详见本专辑)。本研究在国内首次使用 DNA 条形码技术分析海洋环境样品中浮游动物的遗传多样性, 探讨该技术在海洋浮游动物长期观测研究中应用的可行性, 阐明浮游动物群落遗传多样性与物种多样性之间的相关性, 同时为胶州湾浮游动物的多样性研究积累资料。

1 材料与方法

1.1 样品采集

样品采集搭载 2006 年度胶州湾生态站月季调查航次, 使用浅水 II 型浮游生物网在 D1 站进行从底至表的垂直拖网(孙松等, 2008)。采集到的样品分作两份, 用作形态分析的样品使用 5% 的福尔马林海水固定, 带回实验室后使用尼康显微成像系统镜检分析; 用作分子生物学分析的样品过滤到高温处理过的 0.45 μ m GFF 滤膜上, 液氮冷冻备用。

1.2 引物开发

从 GenBank 下载浮游动物主要类群的线粒体全基因组中的 *cox1* 基因序列, 翻译为对应氨基酸序列后使用 Muscle v3.6 (Edgar, 2004) 比对, 得到的结果利用 TranslatorX (<http://translatorx.co.uk/>) 重新翻译成比对好的核苷酸序列。使用 Hyden 软件设计兼并引物(Linhart *et al.*, 2007), 使用 Oligo 7.0 筛选合适的引物组合, 最终得到一对扩增长度约为 470bp 的引物组合, CO318U: CTRATTGGTGGTTTYGGNAHTG 和 CO820L: CACTTCNGGGTGACCRAARAAYCA。

1.3 线粒体 *cox1* 基因文库构建

根据厂家说明, 使用 E.Z.N.A. HP Tissue DNA Maxi Kit 提取基因组 DNA, 使用本研究设计的引物扩增得到 *cox1* 片段序列, 反应采用 50 μ l 体系, 条件如下: 94 5min; 94 1min, 45 30s, 72 40s, 36 个循环; 72 10min。扩增产物使用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测并使用 DNA 凝胶回收试剂盒(Omega)纯化目标片段。使用 PMD18T 载体试剂盒连接纯化产物, 以 TOP10 感受态细胞为宿主, 蓝白斑结合 PCR 方法筛选阳性转化子, 由北京诺赛生物技术公司完成测序。

1.4 数据分析

使用 Phred/Phrap/Consed 套件(Ewing *et al.*, 1998) 处理原始 ab1 峰图文件, 剔除载体和引物序列, 仅保留质量 30(测序错误率小于 0.1%) 以上的测序结果。序列经 Muscle v3.6 比对后, 使用 Mothur 进行嵌合体检验; 使用 Paup*v4b10 计算 *cox1* 序列间的遗传差异(K2P), 使用 DOTUR 软件包划分操作分类单元(OTU)(Schloss *et al.*, 2005), 并构建稀缺性曲线; 使用 SPADE 软件计算物种丰富度和种群多样性。根据与 NCBI 非冗余数据库 BLASTn 比对的结果, 分析 OTU 的分类地位(Machida *et al.*, 2009)。如果 BLASTn 分值高于 750 且序列相似性大于 97%, 则认为 OTU 与该比对序列属于同一物种。如果 BLASTn 分值高于 350, 序列相似性在 82%—97% 之间, 则认为 OTU 与比对序列属于同一类群, 但无法确定具体种类。不符合以上标准的 OTU 归为“未鉴定生物”类群。

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 2 个蒙特卡洛分析, 使用 4 条马尔科夫链(1 条热链, 3 条冷链), 运行 2000000 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 5000 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 形态鉴定结果

胶州湾 D1 站采集到的浮游动物样品中, 共鉴定浮游动物 19 种, 幼体和卵 12 类(表 1)。其中桡足类 10 种, 枝角类和水母类 2 种, 毛颚类、十足类、腹足类、被囊类以及原生动各 1 种。其中小拟哲水蚤、洪氏纺锤水蚤、拟长腹剑水蚤、鸟喙尖头蚤、八斑芮氏水母出现频率较高。

2.2 序列特征和条形码阈值

使用本研究开发的浮游动物通用引物, PCR 扩增获得长度约为 470bp 的单一一条带。随机挑选了 192 个克隆子, 获得 171 个阳性克隆子并测序。使用 Mothur 软件包 chimera.check 功能未发现嵌合体。为了剔除非特异性扩增片段以及核基因组线粒体假基因(Numt)(Bensasson *et al.*, 2001) 的干扰, 将测序得到的序列翻译成对应氨基酸序列, 如存在无义突变则认为该序列是假基因, 从数据库中剔除。根据与 NCBI 非冗余数据库 BLASTn 的比对结果, 判断得到的序列是否源

表 1 胶州湾 D1 站浮游动物种类组成及其相对丰度

Tab.1 Species composition and occurrence frequency of zooplankton in the D1 station, Jiaozhou Bay

种类	出现频率	种类	出现频率
小拟哲水蚤 <i>Paracalanus parvus</i>	++++	洪氏纺锤水蚤 <i>Acartia hongii</i>	++++
羽腕幼体 <i>Bipinnaria larva</i>	+	异体住囊虫 <i>Oikopleura dioica</i>	+
鸟喙尖头蚤 <i>Penilia avirostris</i>	+++	强额孔雀哲水蚤 <i>Pavocalanus crassirostris</i>	+
ohtsukai 纺锤水蚤 <i>Acartia ohtsukai</i>	++	瘦尾胸刺水蚤 <i>Centropages tenuiremis</i>	+
短尾类幼体 <i>Brachyura larva</i>	++	长腕幼体 <i>Ophiopluteus larva</i>	++
长尾类幼体 <i>Macruran larva</i>	+	肥胖三角蚤 <i>Pseudoevadne tergestina</i>	++
八斑芮氏水母 <i>Rathkea octopunctata</i>	+++	双壳类幼体 <i>Bivalva larva</i>	++
强壮箭虫 <i>Sagitta crassa</i>	+	汤氏长足水蚤 <i>Calanopia thompsoni</i>	+
夜光虫 <i>Noctiluca scientillans</i>	+	近缘大眼剑水蚤 <i>Corycaeus affinis</i>	++
虾蛄幼体 <i>Alima larva</i>	+	桡足类幼体 <i>Copepoda larva</i>	+
中华哲水蚤 <i>Calanus sinicus</i>	+	拟长腹剑水蚤 <i>Oithona similis</i>	+++
鱼卵 Fish eggs	+	双刺唇角水蚤 <i>Labidocera rotunda</i>	+
短腕幼体 <i>Brachiolaria larva</i>	+	水母幼体 <i>Hydrozoa larva</i>	+
细螯虾 <i>Leptocheila gracilis</i>	+	蛞蝓 <i>Limacina sp.</i>	+
藪枝螳水母 <i>Obelia spp.</i>	+	多毛类幼体 <i>Polychaeta larva</i>	+
腹足类幼体 <i>Gastropoda larva</i>	+		

注：“+”的数目表示物种在定性观察时出现的频率，表示出现频率的相对比例

于 *cox1* 基因，剔除非同源序列。比对后总共获得 149 条有效序列，去除引物后序列长度从 454 到 478 不等，以上序列均已提交 NCBI 的 GenBank 数据库 (HQ848784—HQ848931, HQ857599)。

基于 K2P 距离胶州湾浮游动物样品 *cox1* 序列的错配分布图(Mismatch distribution)呈双峰型(图 1)，其中第一个峰对应的遗传差异非常小(<0.057)，该范围与胶州湾浮游动物种内遗传差异水平相当(本专辑)，且第一个峰与其它峰之间存在明显的间隙，故认为该峰表征种内水平的遗传差异。不同 OTU 判定阈值与其对应物种丰度(Species Richness)和稀有度(Rarefaction)的关系如图 2A 所示，在遗传距离为 0.06—

0.16 的区间内，物种丰度与稀有度变化趋缓，斜率几乎为零，再次验证了条形码间隙的存在。因此，本研究使用 6%作为判定 OTU 的阈值，如果序列两两比较遗传差异小于 6%，则认为这两条序列来自同一种类的浮游动物；如果序列间遗传差异大于 6%，则判定它们属于不同种类。

2.3 基于 *cox1* 基因克隆文库的胶州湾浮游动物物种组成分析

利用 DOTUR 软件分析，将序列相似性大于 94% 的克隆子定义为同一个 OTU，149 条序列归属为 37 个 OTU(表 2)，其中 18 个 OTU 只有一个克隆，其它最多的四个 OTU 分别含有 24、18、18、13 个克隆。同时，

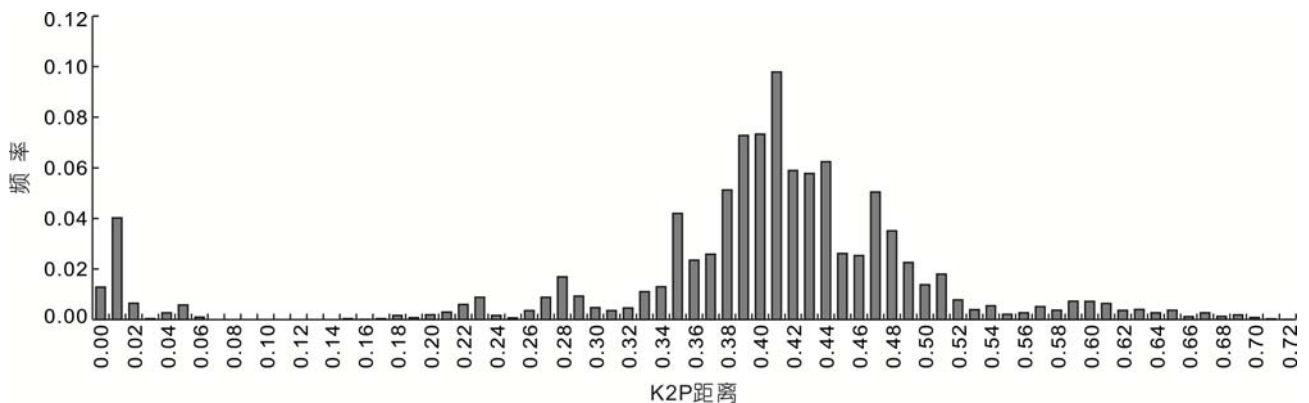


图 1 胶州湾浮游动物环境样品 149 条 DNA 条形码基因序列错配分布图

Fig.1 Mismatch distribution of pairwise genetic distances (K2P) for 149 environmental barcodes from the Jiaozhou Bay

根据 DOTUR 软件稀有度统计方法生成的数据绘制稀缺性曲线和两种物种丰富度(Chao1 和 ACE)饱和曲线(图 2B)。结果显示稀缺性曲线仍逐渐上升,但在 80 条序列处增幅相对变缓;Chao1 和 ACE 物种丰富度饱和曲线在 100 条序列处趋于平缓,不同方法估算得到的物种丰富度趋于一致;样品覆盖率较高,达 87.9%(表 3)。结果表明虽然取样数量仍未达到饱和,但该 *cox1* 文库的估算物种丰富度正趋向稳定,该库容可以用于浮游动物物种组成的比较分析(Kemp *et al.*, 2004)。

基于 *cox1* 序列胶州湾 D1 站浮游动物物种丰富度分析结果见表 3, 使用 Chao1 方法和 ACE 方法估算得到的物种丰富度在 95% 置信区间内无显著差异, 分别为 62.5 和 60.5。

根据与 GenBank 非冗余数据库的 BLASTn 比对结果(表 2), 4 个 OTU 的序列与数据库中其它序列相似程度较低, 无法确定它们的所属类群。剩余 33 个 OTU 隶属于 12 个类群, 其中 19 个 OTU 与已知序列相似程度非常高(>97%), 可以实现种水平的鉴定。12 个类群中种数最多的为桡足类(Copepoda, 8 种)、十足类(Decapoda, 8 种)和水母类(Hydrozoa, 4 种)。与形态鉴定的结果比较, 基于 *cox1* 序列分析得到的胶州湾 D1 站浮游动物种数更多, 且种类组成存在一定差异: 形态鉴定时出现频率较高的种类在 *cox1* 基因克隆库分析的结果中都得到了重现; 低频种类中羽腕幼体、短腕幼体、汤氏长足水蚤、瘦尾胸刺水蚤以及异体住囊虫在基于 *cox1* 序列的文库分析中未检出; 水母类在形态鉴定中仅辨认出八斑芮氏水母 1 种, 而分子生物学的结果显示水母至少包括 4 个不同的种类。值得一提的是, 在形态鉴定和 DNA 提取前处理的过程中, 浮游动物样品中并未发现行游泳生活方式的十足类成体和仔幼鱼, 以及行固着生活方式的藤壶成体; 而在 *cox1* 序列文库的检出结果中, 十足类、鱼类和藤壶类的种数分别为 8 种、1 种和 2 种, 以上种类应该以浮游幼体、卵甚至肠道内含物的形式存在于样品中。

2.4 浮游动物 *cox1* 序列的系统发育分析

针对 149 条胶州湾 D1 站环境样品 *cox1* 序列和其它已知物种序列构建的贝叶斯最优树如图 3、图 4 所示。与 BLASTn 比对结果一致, 遗传距离小于 6%(pairwise K2P distance)的克隆(种类)均聚在一起, 形成相互独立的单系枝。这些单系枝的通常较短, 彼此间由长的进化枝连接; 结果支持上述短枝簇中的克隆序列来自同一个种(OTU)。强壮箭虫显示出较高水平的种内遗传差异, 18 个克隆包含 14 种单倍型, 分别聚为 3 个分枝。

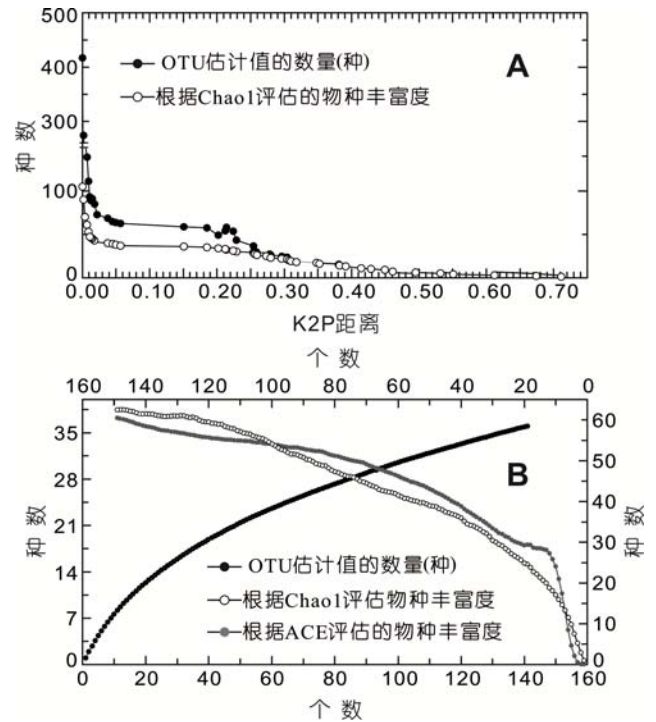


图 2 不同 OTU 判定阈值与其对应物种丰富度(Chao1)和稀有度的关系(A)以及胶州湾环境样品 DNA 条形码文库的稀缺性分析(B)

Fig.2 Relationship (A) between species richness estimated by Chao1, rarefaction and the percentage of sequence difference used for these estimations, and rarefaction analysis (B) of 149 environmental barcodes from the Jiaozhou Bay

就更高水平的分类阶元而言, 12 个类群内不同种类的序列都聚到了一起。由于序列相似度较低, JC21 所代表的 OTU 无法根据 BLASTn 的结果判定其所在生物类群。在最优贝叶斯树中, 该 OTU 聚到了十足类内部, 且节点支持率较高, 结果显示该 OTU 应隶属于十足类。除了十足类外, 其它 11 个类群的不同种类均聚在一起, 形成单系枝。结果支持刺胞动物、桡足类、纽虫类、枝角类、腹足类以及藤壶类的单系性。JC46 和 JC60 所对应 OTU 在整个系统树的基部聚到一起, 结果表明上述两个 OTU 所属生物类群较为原始, 可能隶属于海洋原生动物。

3 讨论

3.1 DNA 条形码, 浮游动物物种鉴定的利器

由于分化速率过慢, *cox1* 序列无法区分珊瑚虫、栉水母以及海绵的近缘种(Neigel *et al.*, 2007; Bucklin *et al.*, 2011); 但基于 *cox1* 序列的 DNA 条形码技术已被证明是浮游动物物种鉴定的有效工具(Lahaye *et al.*, 2008; Bucklin *et al.*, 2011), 适用于包括桡足类(Bucklin

表 2 胶州湾浮游动物环境样品 DNA 条形码 BLASTn 分析结果

Tab.2 BLASTn search results for environmental barcodes of representative clones to subject sequences in the GenBank

RCG	Acc	种类	分类类群	分值	E 值	相似性	NC
JC3	HQ718598	<i>Crassostrea gigas</i>	Bivalvia	856	0	100	2
36C56	HM045337	<i>Penilia avirostris</i>	Branchiopoda	839	0	99	4
36C21	EU675911	<i>Pseudevadne tergestina</i>	Branchiopoda	856	0	100	18
36C15	HQ700946	<i>Sagitta crassa</i>	Chaetognatha	850	0	99	18
36C16	AF234812	unidentified	Cirripedia	385	2.00E-103	83	2
36C32	AY823019	<i>Chthamalus challengeri</i>	Cirripedia	839	0	99	3
36C72	HM045362	<i>Labidocera rotunda</i>	Copopoda	845	0	99	1
JC13	HM045396	<i>Parvocalanus crassirostris</i>	Copopoda	850	0	99	2
36C1	HM045293	<i>Acartia ohtsukai</i>	Copopoda	856	0	100	5
36C25	AF332769	<i>Calanus sinicus</i>	Copopoda	850	0	99	5
36C26	EU599542	<i>Oithona similis</i>	Copopoda	839	0	99	5
36C62	EU599508	<i>Acartia hongii</i>	Copopoda	856	0	100	7
36C17	HQ718595	<i>Corycaeus affinis</i>	Copopoda	856	0	100	13
36C11	EU856802	<i>Paracalanus parvus</i>	Copopoda	856	0	100	24
JC1	GQ260917	unidentified	Decapoda	355	1.00E-94	82	1
JC34	HQ700926	unidentified	Decapoda	450	2.00E-126	85	1
JC48	EU284139	unidentified	Decapoda	436	4.00E-119	85	1
JC54	EU727203	unidentified	Decapoda	460	3.00E-126	85	1
JC66	EU682862	unidentified	Decapoda	455	1.00E-124	84	1
JC76	HM237597	<i>Charybdis japonica</i>	Decapoda	856	0	100	1
JC79	AY350991	unidentified	Decapoda	433	6.00E-118	83	1
JC11	EU169922	unidentified	Decapoda	496	7.00E-137	87	2
36C35	AM921831	unidentified	Gastropoda	366	6.00E-98	82	6
36C13	HM053532	<i>Sugiura chengshanense</i>	Hydrozoa	850	0	99	1
JC74	AY937372	unidentified	Hydrozoa	499	5.00E-138	86	1
36C76	HM053515	<i>Clytia hemisphaerica</i>	Hydrozoa	848	0	99	5
JC15	AY789885	unidentified	Hydrozoa	533	4.00E-154	88	5
JC40	EU489497	unidentified	Nemertea	507	3.00E-140	86	1
JC51	FJ594739	unidentified	Nemertea	455	1.00E-124	84	1
JC14	GU227140	unidentified	Polychaeta	350	3.00E-91	82	1
JC5	GQ844250	<i>Coscinodiscus wailesii</i>	Stramenopiles	752	0	98	1
JC25	AB443535	<i>Undaria pinnatifida</i>	Stramenopiles	850	0	99	2
JC55	AB547257	<i>Pennahia argentata</i>	Teleostei	850	0	99	1
JC46	unidentified	unidentified	unidentified				1
JC60	unidentified	unidentified	unidentified				1
JC69	unidentified	unidentified	unidentified				1
JC21	unidentified	unidentified	unidentified				3

注: RCG: OTU 的代表序列; Acc: NCBI 登录号; NC: 克隆的数量(个)

表 3 胶州湾环境样品 DNA 条形码文库物种丰富度指数

Tab.3 Zooplankton species richness index revealed by the environmental barcode analysis in the Jiaozhou Bay

样品	NC	NO	OTUs 丰富度指数		ECA
			ACE (95% CIs)	Chao 1 (95% CIs)	
胶州湾	149	37	60.5 (45.8;100.1)	62.5 (45.0;117.8)	0.879

注: CIs: 置信区间; NC: 克隆子数量; NO: DOTUR 鉴定出的 OTU 数量; ECA: 样本覆盖率

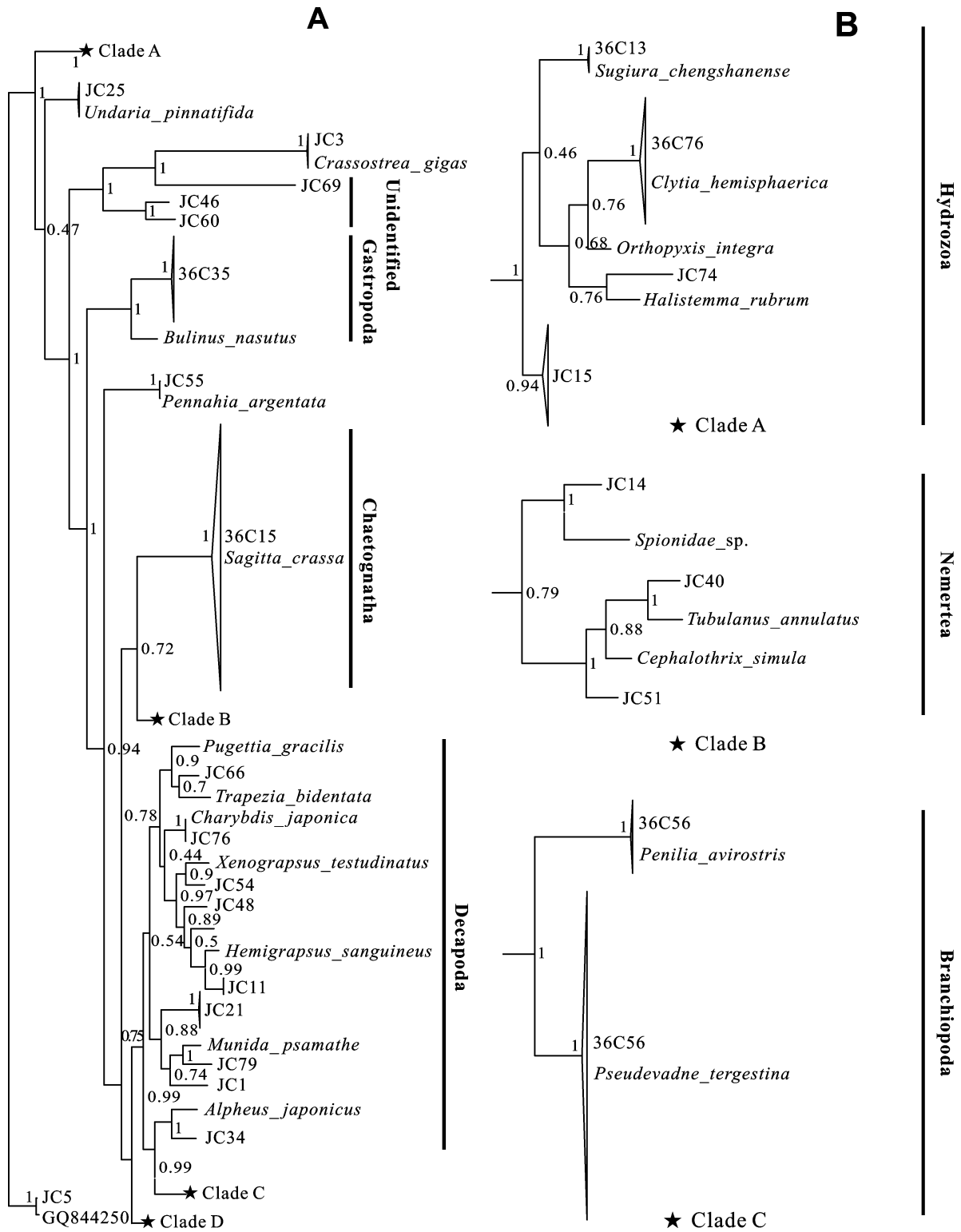


图3 根据胶州湾环境样品 DNA 条形码及 BLASTn 检索获得的高相似度物种 *cox1* 序列构建的最优贝叶斯树

Fig.3 Best Bayesian tree of the *cox1* sequences from both marine environmental barcodes and their close relatives revealed by the BLASTn analysis
同一物种的不同单倍型以三角形表示, 三角形的宽度和高度分别表示种内遗传差异和不同单倍性出现的频数(A 和 B)。为了表述清晰, 部分单系枝以五边形表示, 其物种组成及内部关系见图 3B 和图 4

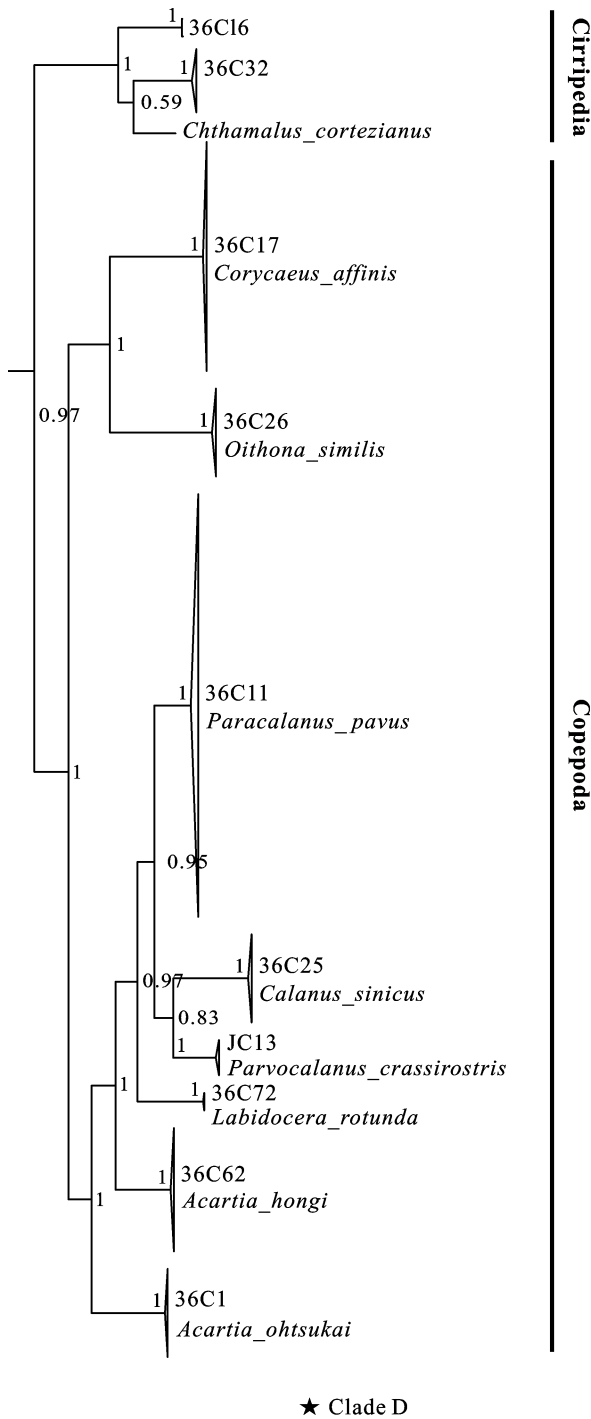


图 4 图 3 中桡足亚纲和蔓足亚纲所在单系枝的系统发育树(接图 3)

Fig.4 Phylogenetic tree for the monophyletic clade containing Copepoda and Cirripedia in Fig.3

et al, 2003; Bttger-Schnack *et al*, 2010)、磷虾类 (Bucklin *et al*, 2007)、毛颚类(Jennings *et al*, 2010b)、

刺胞动物类(水母亚门)(Ortman, 2008¹⁾; Ortman *et al*, 2010)、端足类(Browne *et al*, 2007)、十足类(Plaisance *et al*, 2009)以及软体动物(Jennings *et al*, 2010a)等几乎所有浮游动物类群。本研究环境样品 DNA 条形码序列错配分布呈现双峰型, 两峰之间存在明显的间隙: OTU 内(种内)遗传最大差异为 5.7%, 不同 OTU 间(种间)遗传最小差异为 14.3%; 结果表明胶州湾浮游动物种内、种间遗传差异显著, 基于 *cox1* 序列的 DNA 条形码是该海域浮游动物种类鉴定的有效手段。本研究中环境样品 DNA 条形码种内差异为 0.97%, 该差异与其它海洋后生动物 DNA 条形码研究结果的范围一致: 十足类 0.46% (Costa *et al*, 2007); 端足类 0.74% (Costa *et al*, 2007); 毛颚类 1.45% (Jennings *et al*, 2010b); 腹足类 2.6% (Meier *et al*, 2008); 马尾藻海浮游动物 1.14% (Bucklin *et al*, 2010b); 北冰洋浮游动物 0.75% (Bucklin *et al*, 2010a)。

值得注意的是, 强壮箭虫 *cox1* 序列种内遗传差异较大(3.0%, 0%—5.7%), 其最大值已与其它类群某些近缘种种间差异相当(Hebert *et al*, 2003b)。箭虫内较高的种内遗传差异在其它研究中已有报道(Jennings *et al*, 2010b), 该文作者认为该遗传差异是由于大尺度地理分隔造成的。然而本研究所有箭虫均采自胶州湾, 个体间不存在地理隔离。根据泡状组织的分布, 强壮箭虫可分为四种不同类型(萧贻昌, 2004)。强壮箭虫的遗传差异与泡状组织分布模式是否存在对应关系, 尚有待于进一步的比较研究。

基于 *cox1* 序列的后生动物 DNA 条形码数据库建设工作刚刚起步, 许多重要类群的常见种类尚未整合到数据库中(Frezal *et al*, 2008), 由于现有数据库种类覆盖有限, 本研究中部分 DNA 条形码无法确认该序列对应的种类。此外, *cox1* 序列变异速率较快, 饱和和突变显著, 因此可提供的系统发育信息仍有限(Chen *et al*, 2009), 使用该 DNA 条形码推断其对应生物系统发育位置的准确性难以保证。未知种类序列系统发育位置判定的准确性与其近缘种在数据库中的覆盖度呈正比, 建立完善的海洋动物 DNA 条形码数据库是提高 DNA 条形码种类鉴定功效最有效的途径 (Machida *et al*, 2009)。

生物条形码计划(Barcode of Life project)推荐使用 Folmer 开发的后生动物通用引物获取样品的 DNA 条形码标签, 然而该引物在不同类群中扩增效率存

1) Ortman B, 2008. DNA barcoding the Medusozoa and Ctenophora, Dissertations Collection for University of Connecticut. Paper AAI3345202. <http://digitalcommons.uconn.edu/dissertations/AAI3345202:236>

在较大差异,某些种类使用该引物无法成功扩增出目标片段(Bucklin *et al.*, 2010b)。因此,使用通用引物可能造成环境样品中浮游动物多样性的低估(Machida *et al.*, 2009)。为了克服该缺陷,本研究针对浮游动物主要类群设计了一对通用引物,该引物中使用了兼并碱基,兼顾了浮游动物中的多数类群。虽然兼并碱基会降低引物扩增的特异性,造成非特异性扩增,但这些非目标产物可以在凝胶回收以及后期数据处理等控制环节筛选去除。实验结果也证实了该引物的通用性和有效性,该引物可以实现 12 个类群生物 *cox1* 序列的有效扩增,引物的覆盖程度理想。随机挑选的 171 个阳性克隆中,目标片段所占比例为 87.1%,引物的特异性尚可。该引物在追求引物覆盖程度的前提下,实现了特异性的平衡,适用于环境浮游动物样品 DNA 条形码文库的构建,进而分析浮游动物的多样性水平。

3.2 基于形态分析和 DNA 条形码分析浮游动物物种组成的比较

本研究中,基于形态分析的浮游动物种类组成与基于 DNA 条形码序列环境样品的分析结果差异不大,形态分析中出现频率较高的种类均在基于 DNA 条形码的分析中重现,该结果再次确认了使用 DNA 条形码进行浮游动物多样性观测的可行性。DNA 条形码分析预测得到的胶州湾 D1 站物种丰度大于 60,高于形态鉴定得到的种数,表明分子技术可以揭示大量存在但未能依据生物形态特征鉴定的生物(Savin *et al.*, 2004)。此外, DNA 条形码分析可以检测出样品中以不同状态存在的海洋动物(Bucklin *et al.*, 2011),该技术已成功用于磷虾肠道内含物中的浮游动物组成的检测(Tobe *et al.*, 2010),因此网采样品中浮游动物的摄食和浮游生活中的污染可能是导致基于形态特征的镜检分析观测到浮游动物种数低于基于 DNA 条形码的分析结果的原因。

形态鉴定中发现的棘皮动物幼体、汤氏长足水蚤、瘦尾胸刺水蚤以及异体住囊虫等种类并未在基于 DNA 条形码的分析中检出;作者认为浮游动物多呈板块分布(Harris *et al.*, 2000),且上述种类在样品中出现频率较低,因此不同方法结果的差异可能源于采样误差。此外,本研究中仅获得了 149 条环境 DNA 条形码,覆盖率不足 90%,且稀释曲线仍未达到平台期,部分低丰度的种类未被检出,有必要在进一步的分析中增加克隆子的数量,从而更好的重现胶州湾 D1 站浮游动物的多样性。引物错配造成的扩增困难

同样可能导致上述低丰度样品的阴性结果,然而本研究引物设计时已将常见浮游动物 *cox1* 序列作为扩增对象,使用该引物亦能成功扩增包括多棘海盘车、仿刺参、汤氏长足水蚤等浮游动物 *cox1* 序列,因此认为该阴性结果并非引物错配造成的。

基于 DNA 条形码的分析结果中,除了终生浮游动物(holozooplankton)的种类外,还鉴定出了包括底栖动物(蟹)、固着动物(藤壶、牡蛎)和游泳动物(鱼)的种类,这些种类以浮游幼体的形态存在于浮游动物网采样品中(黄世玫, 1983)。以上结果表明了 DNA 条形码相对于传统形态分类的最大优势,可以实现全生活史阶段的浮游动物种类鉴定(Bucklin *et al.*, 2011; Kirby *et al.*, 2005)。浮游幼体是浮游动物的重要组成部分,了解浮游幼体的时空变化对研究海洋生态系统重要功能群的补充机制及其对环境变化的响应具有重要意义(Uye *et al.*, 2002),物种水平的幼体研究是深入理解海洋生物特别是重要渔业资源种类和生态系统关键种类种群动力学的基础(Cowen *et al.*, 2006)。然而由于采样困难,缺乏明显的形态差异,浮游幼体种类鉴定十分困难(Knowlton, 1993),许多幼体甚至无法鉴定到门(Stanwell-Smith *et al.*, 1999)。本研究中,即便在分类专家的协助下,多数浮游幼体仅能鉴定到大类。而以 DNA 条形码为代表的分子生物学方法则为浮游幼体的监测提供了有效手段(Webb *et al.*, 2006; Richardson *et al.*, 2007),而基于分子生物学的分析中,已有标准 DNA 条形码序列种类的浮游幼体均可以准确鉴定到种。然而浮游幼体隶属于多个海洋生物类群,实现浮游幼体种类的准确鉴定需要整合浮游动物、底栖生物以及鱼类的 DNA 条形码信息,浮游动物 DNA 条形码数据库的建设工作任重而道远。

3.3 物种丰度与克隆丰度之间的关系

基于 16s rRNA 文库的宏遗传组分析已成为海洋细菌多样性研究的常规方法(Hardoim *et al.*, 2009; Madrid *et al.*, 2001),文库中 OTU 的频率与样品中对应细菌物种的丰度具有较好的对应关系。而后生动物则不具备这种对应性。本研究中洪氏纺锤水蚤的物种丰度远高于强壮箭虫,然而其对应 OTU 频率却仅为强壮箭虫的 39%。即便是粒径相似的小拟哲水蚤和洪氏纺锤水蚤,物种丰度与 OTU 频率也不对应;两者的物种丰度相似,但前者的 OTU 频率是后者的 3 倍多。

作为多细胞的后生动物,不同种类、发育阶段浮游动物的个体细胞数以及单个细胞中的线粒体丰度在均存在显著差异。因此,使用 DNA 条形码分析浮

游动物群落组成时, OTU 频率反映的并非各浮游动物的丰度, 而是其线粒体的丰度。建立不同浮游动物种类物种丰度和线粒体丰度的关系尚需大量的数据积累。然而线粒体作为生物代谢的重要场所, 其丰度更能反应浮游动物在生态系统物质、能量通路中的作用, 因此以线粒体丰度表征浮游动物的数量具有一定的合理性。

此外, 由于传统 PCR 技术的局限性以及通用引物在不同种类间的扩增效率存在差异, 扩增产物中单倍性的频率与对应线粒体 DNA 模板的频率存在差异。而实时定量 PCR 技术则可以弥补以上不足, 使用实时定量 PCR 技术搭配种特异引物实现浮游动物的定量分析已成为浮游动物分子生态研究的新方向 (Park *et al.*, 2011)。

3.4 结语与展望

本研究的结果表明, 基于 DNA 条形码(*cox1*)的浮游动物多样性研究是可行的。相对于传统基于形态特征的浮游动物鉴定手段, 新方法可以实现浮游幼体等传统方法难以鉴定样品的种类鉴定。通过构建环境样品的 *cox1* 序列文库, 浮游动物研究人员可以快速评估海区浮游动物的物种丰度和群落组成情况, 完善的浮游动物 DNA 条形码数据库则可以耦合序列信息和物种信息。

新一代高通量测序技术正在不断普及, 基于 454 高通量测序的宏基因组和宏遗传组研究方法已成为多样性研究的新手段 (Creer *et al.*, 2010)。高通量测序获得的海量序列信息可以描绘出更加完整的海洋浮游动物多样性图谱。此外, 多样性分析包括种类组成和种类数量两个方面的内容。使用实时定量 PCR 技术搭配种特异引物实现浮游动物的定量分析已成为浮游动物分子生态研究的新方向 (Bucklin *et al.*, 2011)。通过“我国近海浮游动物物种信息提取与应用示范研究”项目的实施, 不断涌现的新方法新技术必将在浮游动物研究中发挥重要的作用。

参 考 文 献

- 王 勇, 焦念志, 2002. 胶州湾浮游植物对营养盐添加的响应关系. 海洋科学, 26(04): 8—13
- 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
- 孙 松, 周 克, 杨 波等, 2008. 胶州湾浮游动物生态学研究 I. 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
- 李开枝, 尹健强, 黄良民, 2007. 河口浮游动物生态学研究进展. 海洋科学, 31(03): 72—75
- 吴玉霖, 孙 松, 张永山等, 2004. 胶州湾浮游植物数量长期动态变化的研究. 海洋与湖沼, 35(6): 518—523
- 郑 重, 李少菁, 许振祖, 1984. 海洋浮游生物学. 北京: 海洋出版社, 653
- 黄世玫, 1983. 胶州湾的浮游动物. 山东海洋学院学报, 13(002): 43—60
- 萧贻昌, 2004. 中国动物志: 无脊椎动物. 毛颚动物门. 箭虫纲. 北京: 科学出版社, 201
- Beaugrand G, 2009. Decadal changes in climate and ecosystems in the North Atlantic Ocean and adjacent seas. Deep-Sea Research Part II-Topical Studies in Oceanography, 56(8—10): 656—673
- Bensasson D, Zhang D X, Hartl D L *et al.*, 2001. Mitochondrial pseudogenes: evolution's misplaced witnesses. Trends in Ecology & Evolution, 16(6): 314—321
- Browne W E, Haddock S H D, Martindale M Q, 2007. Phylogenetic analysis of lineage relationships among hyperiid amphipods as revealed by examination of the mitochondrial gene, cytochrome oxidase I (COI). Integrative and Comparative Biology, 47(6): 815—830
- Bttger-Schnack R, Machida R, 2010. Comparison of morphological and molecular traits for species identification and taxonomic grouping of oncaeid copepods. Hydrobiologia, 666(1): 1—15
- Bucklin A, Frost B W, Bradford-Grieve J *et al.*, 2003. Molecular systematic and phylogenetic assessment of 34 calanoid copepod species of the Calanidae and Clausocalanidae. Marine Biology, 142(2): 333—343
- 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, Steinke D, Blanco-Bercial L, 2011. DNA Barcoding of Marine Metazoa. Annual Review of Marine Science, 3(1): 471—508
- 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
- Chen S, Shao Z, 2009. Isolation and diversity analysis of arsenite-resistant bacteria in communities enriched from deep-sea sediments of the Southwest Indian Ocean Ridge. Extremophiles, 13(1): 39—48
- Costa F O, Dewaard J R, Boutillier J *et al.*, 2007. Biological identifications through DNA barcodes: the case of the Crus-

- tacea. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 64(2): 272—295
- Cowen R K, Paris C B, Srinivasan A, 2006. Scaling of connectivity in marine populations. *Science*, 311(5760): 522—527
- Creer S, Fonseca V G, Porazinska D L *et al*, 2010. Ultrasequencing of the meiofaunal biosphere: practice, pitfalls and promises. *Molecular Ecology*, 19: 4—20
- Edgar R C, 2004. MUSCLE: Multiple sequence alignment with improved accuracy and speed. 2004 Ieee Computational Systems Bioinformatics Conference, Proceedings, 728—729
- Ewing B, Hillier L, Wendl M C *et al*, 1998. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Research*, 8(3): 175—185
- Frezal L, Leblois R, 2008. Four years of DNA barcoding: Current advances and prospects. *Infection Genetics and Evolution*, 8(5): 727—736
- Hardoim C C, Costa R, Araujo F V *et al*, 2009. Diversity of bacteria in the marine sponge *Aplysina fulva* in Brazilian coastal waters. *Appl Environ Microbiol*, 75(10): 3331—3343
- Harris R, Wiebe P, Lenz J *et al*, 2000. ICES zooplankton methodology manual: Academic Press, San Diego, US, 684
- Hays G C, Richardson A J, Robinson C, 2005. Climate change and marine plankton. *Trends in Ecology & Evolution*, 20(6): 337—344
- 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 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, 270: S96—S99
- Jennings R M, Bucklin A, Ossenbr Gger H *et al*, 2010a. Species diversity of planktonic gastropods (Pteropoda and Heteropoda) from six ocean regions based on DNA barcode analysis. *Deep-Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 57(24—26): 2199—2210
- Jennings R M, Bucklin A, Pierrot-Bults A, 2010b. Barcoding of Arrow Worms (*Phylum chaetognatha*) from Three Oceans: Genetic Diversity and Evolution within an Enigmatic Phylum. *Plos One*, 5(4): e9949. doi:10.1371/journal.pone.0009949
- Kemp P F, Aller J Y, 2004. Bacterial diversity in aquatic and other environments: what 16S rDNA libraries can tell us. *Fems Microbiology Ecology*, 47(2): 161—177
- Kirby R R, Lindley J A, 2005. Molecular analysis of Continuous Plankton Recorder samples, an examination of echinoderm larvae in the North Sea. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 85(3): 451—459
- Knowlton N, 1993. Sibling species in the sea. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 24: 189—216
- Lahaye R, Van Der Bank M, Bogarin D *et al*, 2008. DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(8): 2923—2928
- Linhart C, Shamir R, 2007. Degenerate primer design: theoretical analysis and the HYDEN program. *Methods Mol Biol*, 402: 221—244
- Machida R J, Hashiguchi Y, Nishida M *et al*, 2009. Zooplankton diversity analysis through single-gene sequencing of a community sample. *Bmc Genomics*, 10(438): doi:10.1186/1471-2164-10-438
- Madrid V M, Taylor G T, Scranton M I *et al*, 2001. Phylogenetic diversity of bacterial and archaeal communities in the anoxic zone of the Cariaco Basin. *Appl Environ Microbiol*, 67(4): 1663—1674
- Meier R, Zhang G Y, Ali F, 2008. The use of mean instead of smallest interspecific distances exaggerates the size of the “Barcoding Gap” and leads to misidentification. *Syst Biol*, 57(5): 809—813
- Neigel J, Domingo A, Stake J, 2007. DNA barcoding as a tool for coral reef conservation. *Coral Reefs*, 26(3): 487—499
- Ortman B, Bucklin A, Pages F *et al*, 2010. DNA Barcoding the Medusozoa using mtCOI. *Deep-Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 57(24—26): 2148—2156
- Park E J, Kim K H, Abell G C *et al*, 2011. Metagenomic analysis of the viral communities in fermented foods. *Appl Environ Microbiol*, 77(4): 1284—1291
- Plaisance L, Knowlton N, Paulay G *et al*, 2009. Reef-associated crustacean fauna: biodiversity estimates using semi-quantitative sampling and DNA barcoding. *Coral Reefs*, 28(4): 977—986
- Planque B, Taylor A H, 1998. Long-term changes in zooplankton and the climate of the North Atlantic. *Ices Journal of Marine Science*, 55(4): 644—654
- Richardson D E, Vanwey J D, Exum A M *et al*, 2007. High-throughput species identification: from DNA isolation to bioinformatics. *Molecular Ecology Notes*, 7(2): 199—207
- Savin M C, Martin J L, Legresley M *et al*, 2004. Plankton diversity in the Bay of Fundy as measured by morphological and molecular methods. *Microbial Ecology*, 48(1): 51—65
- Schloss P D, Handelsman J, 2005. Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(3): 1501—1506
- Stanwell-Smith D, Peck L S, Clarke A *et al*, 1999. The distribution, abundance and seasonality of pelagic marine invertebrate larvae in the maritime Antarctic. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, 354(1382): 471—484
- Tobe K, Meyer B, Fuentes V, 2010. Detection of zooplankton items in the stomach and gut content of larval krill, *Euphaus-*

- sia superba*, using a molecular approach. *Polar Biology*, 33(3): 407—414
- 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
- Webb K E, Barnes D K A, Clark M S *et al*, 2006. DNA barcoding: A molecular tool to identify Antarctic marine larvae. *Deep-Sea Research Part II-Topical Studies in Oceanography*, 53(8—10): 1053—1060

SPECIES COMPOSITION ANALYSIS OF ZOOPLANKTON IN THE JIAOZHOU BAY USING ENVIRONMENTAL BARCODING OF THE MITOCHONDRIAL *cox1* GENE

WANG Ren-Cheng^{1,2}, WANG Min-Xiao¹, CHENG Fang-Ping^{1,2},
LI Chao-Lun¹, SUN Song^{1,3}

(1. Key Laboratory of Marine Ecology and Environmental Sciences, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071; 2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100049; 3. Jiaozhou Bay Marine Ecosystem Research Station, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071)

Abstract Zooplankton plays vital roles in energy and matter transfer through the system. Here we present the first result of a zooplankton community study in the Jiaozhou Bay based on DNA barcodes. An environmental DNA barcode library was constructed to study zooplankton composition in the Jiaozhou Bay. A total of 149 mitochondrial *cox1* gene sequences were determined from the *cox1* gene library. The occurrence of 37 OTUs (species) was estimated when the genetic divergence of 6% was adopted as the threshold to separate different species. Based on the results from BLASTn analysis and Bayesian phylogenetic constructions on the DNA barcodes, 19 OTUs, which showed high degrees of similarity (>97%) between the query and database, could be identified to the species level. Compared to the results revealed by DNA barcodes, fewer species would be estimated using microscope analysis on the base of their morphological variations. The merozooplankton species, such as *Chthamalus challengerii* and *Crassostrea gigas*, identified by the DNA barcodes here were supposed to be sampled in the dispersal life history phase as pelagic larvae or eggs. Our results highlight the possibility of identifying larvae in the zooplankton samples using the DNA barcoding techniques. In conclusion, fast estimation of zooplankton richness can be achieved by the environmental DNA barcoding approach.

Key words Zooplankton, *cox1* gene, DNA barcodes, Community, Environment