

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2018.17363

利用 DNA 条形码 COI 基因分析我国重要贝类系统进化关系

赵庆^{1,3}, 吴彪^{1,2}, 刘志鸿^{1,2}, 刘寒苗^{1,3}, 孙秀俊^{1,2}, 周丽青^{1,2}, 张高伟^{1,3}, 杨爱国^{1,2}

1. 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室, 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东 青岛 266071;

2. 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室, 青岛海洋科学与技术国家实验室, 山东 青岛 266273;

3. 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海海洋大学, 上海 201306

摘要: DNA 条形码旨在通过 PCR 技术获得一段 DNA 序列, 在物种水平上对现存生物类群和未知生物材料进行识别和鉴定。线粒体细胞色素 C 氧化酶 I (COI) 基因是常用 DNA 条形码基因之一, 为研究 COI 基因作为 DNA 条形码在贝类系统进化中的评估效果, 本文利用 PCR 技术扩增获得了 60 个贝类物种的 353 条 COI 基因序列, 通过聚类法构建了 neighbor-joining (NJ) 进化树, 同时还对 7 个物种不同地理群体的遗传进化情况进行了分析。结果表明, 选用的 COI 基因引物在大多数贝类中通用性较强, 除在珍珠贝目中的扩增效率只有 10% 以外, 在整个研究中扩增效率达到 82.7%; 60 个物种中除太平洋潜泥蛤 (*Panopea abrupta*)、沼蛤 (*Limnoperna fortunei*) 和魁蚶 (*Scapharca broughtoni*) 等 8 个物种在进化树中的进化地位与传统系统分类具有一定差别外, 其他物种的聚类关系与传统分类基本一致; 对 7 个物种、共 26 个地理群体的聚类分析发现, COI 基因基本能对同一物种的不同地理群体进行聚类, 只有极个别群体或群体中的某个个体存在聚类混乱现象。综上所述, COI 基因在一定程度上适用于贝类物种鉴别和系统发育研究, 丰富了 COI 基因在物种鉴别应用中的科学数据。

关键词: DNA 条形码; 线粒体 COI; 贝类; 系统进化

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2018)04-0847-11

现今地球上估计有 1500 多万物种, 但已知的生物只有 174 万种, 其中动物有 110 多万种。而传统的物种鉴定主要通过形态学、解剖学和生理学等方法, 但由于表型可塑性和遗传变异性, 常导致传统分类无法准确鉴定^[1]。2003 年, 加拿大生物学家 Paul Herbert 首次提出了以基因序列作为鉴别不同物种的“条形码”, 即 DNA 条形码^[2-4]。DNA 条形码一经提出, 得到了许多学者的肯定, 并在很多物种中得到应用, 在物种鉴定、发现隐存种等方面为传统分类方法提供了科学的辅助数据。细胞色素 C 氧化酶 I (cytochrome oxidase subunit I, COI) 基因, 作为重要的线粒体基因, 具有母系遗传、进化速度快、核苷酸替代率高等特点, 在物种鉴定、种群遗传以及系统发育等研究

领域得到广泛应用。作为 DNA 条形码的发展之初, Herbert 等^[8]分析了除刺细胞门外, 11 个门 13320 个物种的 COI 基因序列, 发现其序列间的差异可以很好的区分开所有研究的物种; 而且在物种系统发育过程中, 它的变异速度刚好能使种内差异小于种间差异^[9-11], 因此在对大多数物种的研究中采用 COI 作为 DNA 条形码的首选基因^[12]。

软体动物门是动物界里仅次于节肢动物门的第二大门类, 据不完全统计, 迄今已记载现生贝类超过十多万种, 化石种类约 3.5 万种^[13]。收集、保存贝类的实物和信息资源, 是人类认识贝类、合理保护和开发贝类资源的重要基础。软体动物按其体制是否对称, 贝壳、鳃、外套膜和神经等特征的异同进行分类, 但软体动物种类丰富, 许

收稿日期: 2017-10-01; 修订日期: 2018-03-13.

基金项目: 科技部科技基础性工作专项(2013FY110700); 国家水产种质资源共享服务平台(2017DKA30470).

作者简介: 赵庆(1992-), 男, 研究生, 研究方向为贝类遗传与免疫. E-mail: sjxapy@163.com

通信作者: 刘志鸿, 研究员, 研究方向为贝类遗传与免疫. E-mail: liuzh@ysfri.ac.cn

多种形态相似,且环境对其形态影响较大(表型可塑性),建立并保存不会随环境的变化而变化的 DNA 条形码信息对研究其分类地位和系统发育具有重要科学意义。

为进一步丰富 COI 在贝类分类及鉴定中的科学数据,本研究通过 PCR 扩增获得了所收集的 353 个体贝类(隶属 3 个纲,13 个目,33 个科,60 个种)的 COI 基因的部分序列,分析了其系统发育关系,以验证 COI 基因在揭示贝类系统进化关系与传统分类关系的一致性,同时对同一物种的不同

地理群体进行了聚类分析,为贝类 DNA 条码数据库的建设提供参考数据。

1 材料与方法

1.1 样品采集

实验贝类主要采自于中国沿海,均通过形态特征进行鉴定,共 426 个个体,属于 13 个目 33 个科 60 个物种。样品采集后,剪取 DNA 提取组织并置于酒精中,与标本材料低温运回实验室,−80℃ 保存备用。具体物种信息及采样地点如表 1 所示。

表 1 用于分析 COI 序列的物种及其采样地点

Tab. 1 Information on classification and collection of species used for COI sequences analysis

目 order	科 family	物种名 species	采集地点 location
原始腹足目 Archaeogastropoda	马蹄螺科 Trochidae	锈凹螺 <i>Chlorostoma rustica</i>	青岛 Qingdao
		单齿螺 <i>Monodonta labio</i>	青岛 Qingdao
	鲍科 Haliotidae	皱纹盘鲍 <i>Haliotis discus hannai</i>	海口 Haikou
		蝶螺科 Turbinidae	朝鲜花冠小月螺 <i>Lunella coronata coreensis</i>
	粒花冠小月螺 <i>Lunella coronata granulata</i>		青岛 Qingdao
中腹足目 Mesogastropoda	凤凰螺科 Strombidae	篱凤螺 <i>Conomurex luhuanus</i>	海口 Haikou
	瓶螺科 Aillpullaridae	大瓶螺 <i>Pomacea canaliculata</i>	青岛 Qingdao
	田螺科 Viviparidae	坚环棱螺 <i>Bellamya lapillorum</i>	蓬莱 Penglai
	蛙螺科 Bursidae	棘蛙螺 <i>Bufo echinata</i>	厦门 Xiamen
	玉螺科 Naticidae	斑玉螺 <i>Natica maculosa</i>	厦门 Xiamen
	锥螺科 Turritellidae	强肋锥螺 <i>Turritella fortilirata sowerby</i>	荣成 Rongcheng
	新腹足目 Neogastropoda	骨螺科 Muricidae	黄口荔枝螺 <i>Thais luteostoma</i>
脉红螺 <i>Rapana venosa</i>			青岛 Qingdao
浅缝骨螺 <i>Murex trapa</i>			厦门 Xiamen
梨形红螺 <i>Rapana rapiformis</i>			上海 Shanghai
织纹螺科 Nassariidae		纵肋织纹螺 <i>Nassarius variciferus</i>	蓬莱 Penglai
蛾螺科 Buccinidae		皮氏蛾螺 <i>Buccinum perryi</i>	青岛 Qingdao
		甲虫螺 <i>Cantharus cecillei</i>	青岛 Qingdao
		褐管蛾螺 <i>Siphonalia spadicea</i>	宁波 Ningbo
		<i>Siphonalia subdilata</i>	烟台 Yantai
		方斑东风螺 <i>Babylonia areolata</i>	海口 Haikou、厦门 Xiamen、上海 Shanghai
	阿地螺科 Atyidae	泥螺 <i>Bullacta exarata</i>	宁波 Ningbo
后鳃目 Opisthobranchia	蚌科 Unionidae	背角无齿蚌 <i>Sinanodonta woodiana</i>	蓬莱 Penglai
蚌目 Unionoida	蚶科 Arcidae	毛蚶 <i>Scapharca kagoshimensis</i>	连云港 Lianyungang、烟台 Yantai、威海 Weihai、大连 Dalian
蚶目 Arcoida		魁蚶 <i>Scapharca broughtoni</i>	青岛 Qingdao、统营 Tongying、荣成 Rongcheng、蓬莱 Penglai、长岛 Changdao
		青蚶 <i>Barbatia obliquata</i>	宁波 Ningbo、厦门 Xiamen、上海 Shanghai、长沙 Changsha

(待续 to be continued)

(续表 1 Tab.1 continued)

目 order	科 family	物种名 species	采集地点 location	
贻贝目 Mytioida	江珧科 Pinnidae	栉江珧 <i>Atrina pectinata</i>	蓬莱 Penglai、青岛 Qingdao	
	贻贝科 Mytilidae	紫贻贝 <i>Mytilus galloprovincialis</i>	青岛 Qingdao、上海 Shanghai	
		沼蛤 <i>Limnoperna fortunei</i>	蓬莱 Penglai	
		厚壳贻贝 <i>Mytilus coruscus</i>	宁波 Ningbo、厦门 Xiamen、上海 Shanghai	
海螂目 Myoida	海螂目 Myidae	翡翠贻贝 <i>Mytilus coruscus</i>	青岛 Qingdao	
	海笋科 Pholadidae	砂海螂 <i>Mya arenaria</i>	烟台 Yantai、上海 Shanghai	
	海笋科 Pholadidae	东方海笋 <i>Monothyra orientalis</i>	长沙 Changsha	
筍螂目 Pholadomyoida	篮蛤科 Corbulidae	焦河蓝蛤 <i>Potamocorbula ustulata</i>	宁波 Ningbo	
	潜泥蛤科 Hiatellidae	太平洋潜泥蛤 <i>Panopea abrupta</i>	青岛 Qingdao	
	鸭嘴蛤科 Laternulidae	鸭嘴蛤 <i>Laternula anatina</i>	宁波 Ningbo	
帘蛤目 Veneroida	蛤蜊科 Mactridae	中国蛤蜊 <i>Mactra chinensis</i>	青岛 Qingdao	
		四角蛤蜊 <i>Mactra veneriformis</i>	宁波 Ningbo	
	截蛭科 Solecurtidae	缢蛭 <i>Sinonovacula constricta</i>	青岛 Qingdao、海口 Haikou、上海 Shanghai	
		帘蛤科 Veneridae	短文蛤 <i>Meretrix petechialis</i>	连云港 Lianyungang、宁波 Ningbo
			薪蛤 <i>Mercenaria mercenaria</i>	连云港 Lianyungang
			等边浅蛤 <i>Macridiscus multifarius</i>	青岛 Qingdao
		日本镜蛤 <i>Phacosoma japonicum</i>	蓬莱 Penglai	
		薪蛤 <i>Mercenaria mercenaria</i>	东营 Dongying	
		伊萨伯雪蛤 <i>Clausinella isabellina</i>	温州 Wenzhou	
		青蛤 <i>Cyclina sinensis</i>	宁波 Ningbo、青岛 Qingdao、长沙 Changsha、上海 Shanghai	
		波纹巴非蛤 <i>Paphia undulata</i>	厦门 Xiamen	
		日本镜蛤 <i>Phacosoma japonicum</i>	烟台 Yantai	
	琴文蛤 <i>Meretrix lyrata</i>	海南 Hainan		
文蛤 <i>Meretrix meretrix</i>	上海 Shanghai			
鸟蛤科 Cardiidae	紫石房蛤 <i>Saxidomus purpurata</i>	上海 Shanghai		
	加州扁鸟蛤 <i>Clinocardium californiense</i>	荣成 Rongcheng		
	河蚶 <i>Corbicula fluminea</i>	上海 Shanghai		
	彩虹明樱蛤 <i>Moerella iridescens</i>	舟山 Zhoushan、上海 Shanghai		
	长竹蛭 <i>Solen strictus</i>	宁波 Ningbo		
	大竹蛭 <i>Solen grandis</i>	长沙 Changsha、上海 Shanghai		
	缘雪蛤 <i>Sanguinolaria virescens</i>	海口 Haikou		
珍珠贝目 Pterioida	扇贝科 Pectinidae	栉孔扇贝 <i>Chlamys farreri</i>	青岛 Qingdao	
		虾夷扇贝 <i>Patinopecten yessoensis</i>	大连 Dalian	
牡蛎目 Osteroidea	牡蛎科 Ostreidae	长牡蛎 <i>Crassostrea gigas</i>	青岛 Qingdao	
八腕目 Octopoda	蛸科 Octopodidae	短蛸 <i>Octopus ocellatus</i>	青岛 Qingdao	
		长蛸 <i>Octopus variabilis</i>	青岛 Qingdao	

1.2 DNA 提取及 PCR 扩增

DNA 提取参照有机溶剂抽提法(苯酚氯仿法)^[14-15]方法稍作修改。具体是在 1.5 mL 灭菌离

心管中加入 400 μ L TE 抽提液, 无菌解剖刀取 50~100 mg 组织, 装入离心管中并将其剪碎; 每管加入 40 μ L 10% SDS, 10 μ L 20 mg/mL 蛋白酶 K 终

浓度 400 $\mu\text{g/mL}$, 充分混匀, 放入 55~65 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴锅中温浴 3 h, 消化至溶液澄清; 每管加 300 μL 6 mol/L NaCl 后, 在旋涡混匀器上快速离心混匀 30 s, 12000 rpm 离心 20 min, 移取上清到另一离心管中; 每管加入等体积的酚: 氯仿: 异戊醇 (25 : 24 : 1), 缓慢颠倒混匀约 8 min, 12000 rpm 离心 10 min, 将上清液移至另一离心管中, 重复抽提一次; 每管加 1/10 体积的 3 mol/L NaCl 和 2 倍体积的无水乙醇, 混匀后置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 中沉淀 1 h, 12000 rpm 离心 15 min 后弃上清; 加入 700 μL 70% 乙醇, 缓慢颠倒 30 min, 离心 10 min, 洗两次; 倒掉乙醇后, 在超净台上吹干, 然后加入灭菌水溶解沉淀。利用琼脂糖凝胶电泳检测提取 DNA 的完整性, NANO DROP 1000 分光光度计检测其浓度和纯度。用三蒸水将 DNA 浓度稀释至 50 $\mu\text{g/mL}$, 置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

PCR 扩增在 Eppendorf 仪器上进行。所用的通用 COI-F 和 COI-R 引物^[16-17]分别为引物 L1490: GGTCACAAATCATAAAGATATTGG, 以及 H2198: TAAACTTCAGGGTGACCA AAAAATCA; PCR 反应体系为 25 μL , 包括 ddH₂O 16.8 μL , COI-F 1 μL , COI-R 1 μL , 模板 1 μL , Taq Enzyme 0.2 μL , dNTP 2.5 μL , buffer 2.5 μL 。反应程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min; 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

1.3 数据分析

将 PCR 产物送至上海生工有限公司进行测序, 序列拼接后, NCBI 人工比对, 验证测序准确性。将每个物种随机选取一条序列, 通过 MEGA 6.0 截取了 275 bp 的同源序列, 采用基于距离的矩阵法构建了 NJ 进化树。为研究不同地理群体的遗传差异, 对不同地理群体的序列截取其同源序列并构建了 NJ 进化树。

2 实验结果

2.1 引物通用性

本研究共利用 COI 通用引物 L1490 和 F2198 扩增 60 个物种 426 个个体, 共获得了 353 条序列, 有效扩增效率为 82.7%。其中帘蛤目、蚶目、海

螂目和贻贝目各物种的扩增效率较高, 达到 90% 以上; 原始腹足目扩增效率较低, 仅有 50%; 在珍珠贝目中基本无法扩增获得片段, 只有 10%。总体上, COI 通用引物的扩增效率较高, 能够适用于多数贝类种类的扩增。

2.2 聚类进化关系

如图 1 所示, 由进化树可以看出利用 COI 基因序列进行的聚类关系基本与传统的分类一致。首先, 除沼蛤、大竹蛭(*Solen grandis*)、长竹蛭(*Solen strictus*)、魁蚶、缢蛭(*Sinonovacula constricta*)、栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)、虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)和太平洋潜泥蛤外, 双壳纲各物种聚为一支; 其次, 腹足纲下的新腹足目、中腹足目和原始腹足目被分裂开, 存在交叉现象, 未能明显区分各目间遗传距离差异, 整个纲聚为两个分支, 而且八腕目与蛾螺科的褐管蛾螺、略胀管蛾螺聚为一支; 除大竹蛭、长竹蛭和缢蛭外, 其他帘蛤目的物种聚为一支; 最为特别的是太平洋潜泥蛤, 其传统个体分类为双壳纲海螂目的一种, 但其与中腹足目的斑玉螺聚为一支。

2.3 不同地理群体聚类比较

选取了不同地理群体的 7 种贝类, 通过聚类关系研究了其进化关系。物种名称和采集地点如表 2 所示。通过 MEGA 6.0 构建了 NJ 进化树, 图 2~图 8 分别为方斑东风螺(*Babylonia areolata*)、魁蚶、毛蚶(*Scapharca kagoshimensis*)、青蚶(*Barbatia obliquata*)、厚壳贻贝(*Mytilus coruscus*)、缢蛭、青蛤(*Cyclina sinensis*)不同地理群体聚类图。方斑东风螺全部个体主要聚为两个分支, 上海群体单独聚为一支, 厦门和海口群体整体聚为一支, 其内存在群体交叉现象; 魁蚶蓬莱和荣成群体聚为一支, 其中 5 号蓬莱个体和 5 号荣成个体聚为一支, 其他蓬莱和荣成个体聚类, 统营、长岛和胶南群体聚为一支, 除 2 号统营个体外, 其余群体聚在一起; 毛蚶大连群体单独聚为一支, 连云港、烟台和威海群体聚为一支, 除 4 号烟台个体外, 首先连云港群体聚为一支, 再与烟台群体聚在一起, 最后与威海群体聚在一起; 青蚶上海和厦门群体聚为两支, 宁波群体的个体分别与上海和厦门群体聚在一起, 最后和长沙群体相聚; 厚壳贻

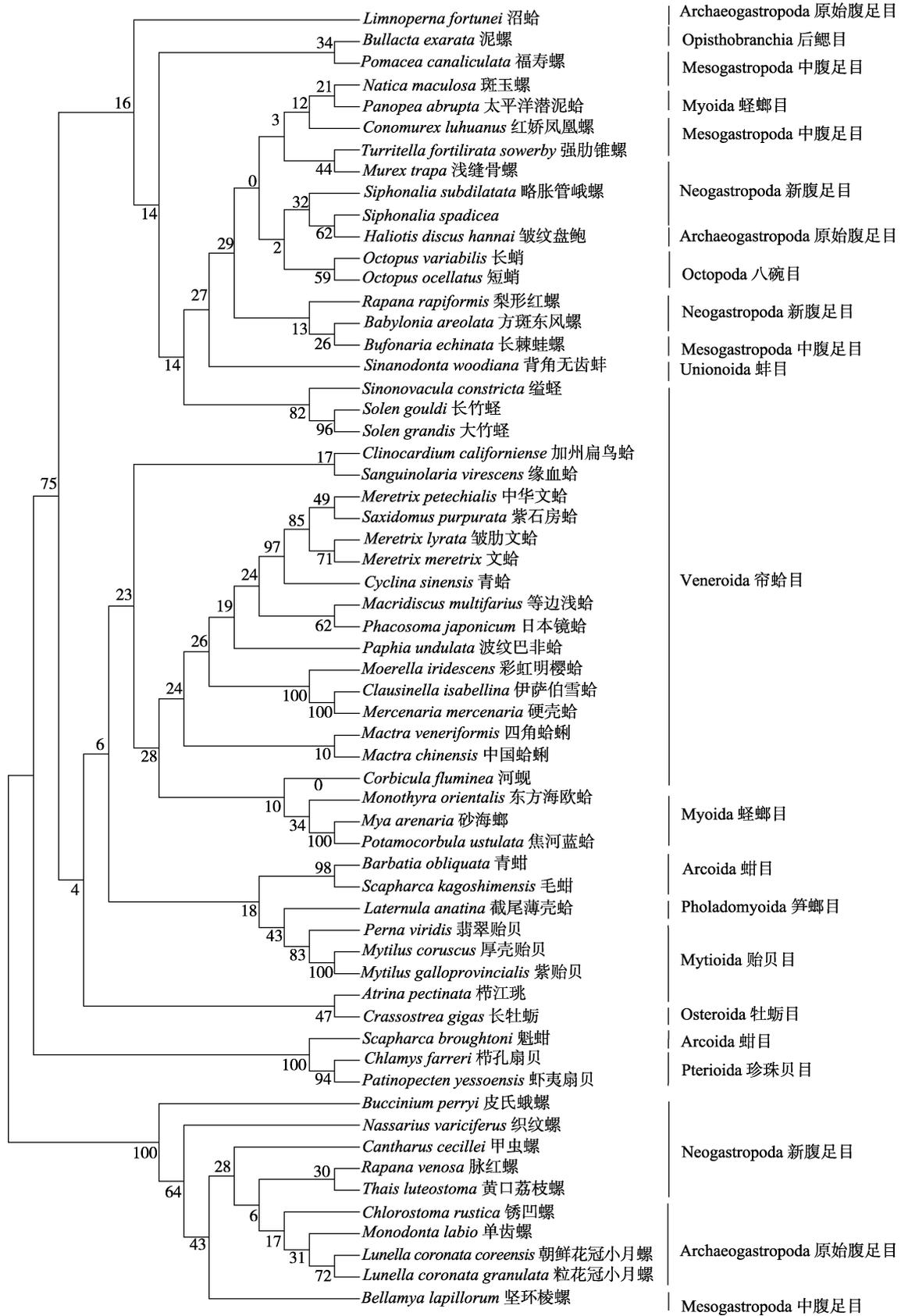


图 1 基于 60 种贝类 COI 序列构建的进化树
Fig. 1 The phylogenetic tree of COI sequences from 60 species in molluscs

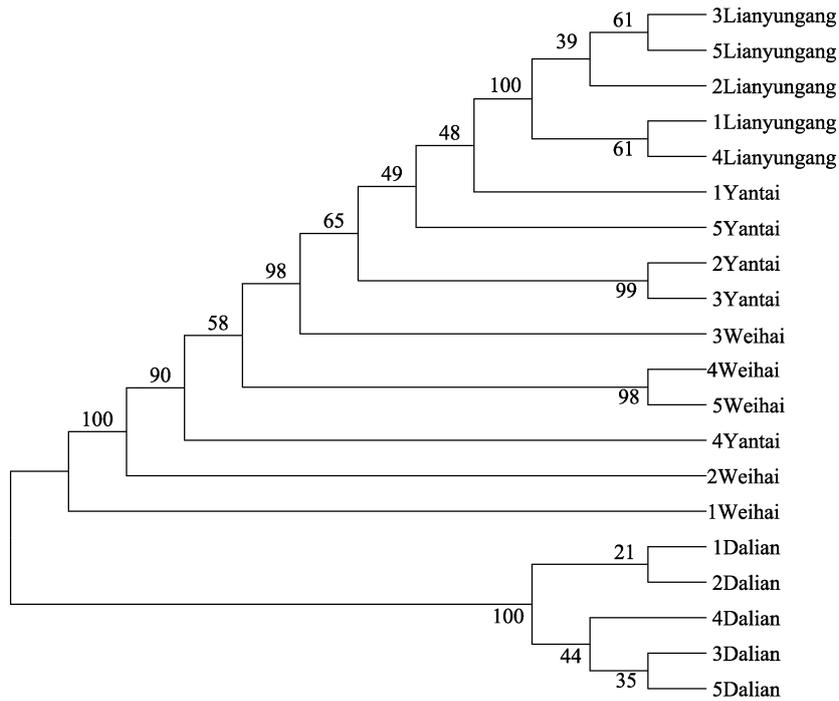


图 4 毛蚶不同地理群体构建的进化树

1、2、3 和 4 表示不同地理群体中个体的编号。

Fig. 4 The phylogenetic tree of *Scapharca kagoshimensis* from different geographical populations. 1, 2, 3 and 4 indicate the numbers of individuals in different geographical groups.

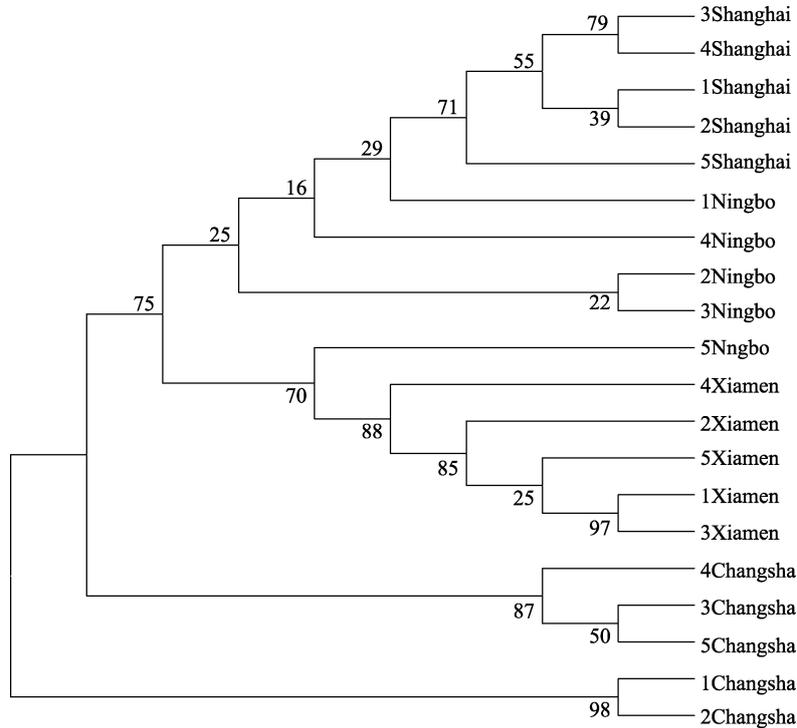


图 5 青蚶不同地理群体构建的进化树

1、2、3、4 和 5 表示不同地理群体中个体的编号。

Fig. 5 The phylogenetic tree of *Barbatia obliquata* from different geographical populations. 1, 2, 3, 4 and 5 indicate the numbers of individuals in different geographical groups.

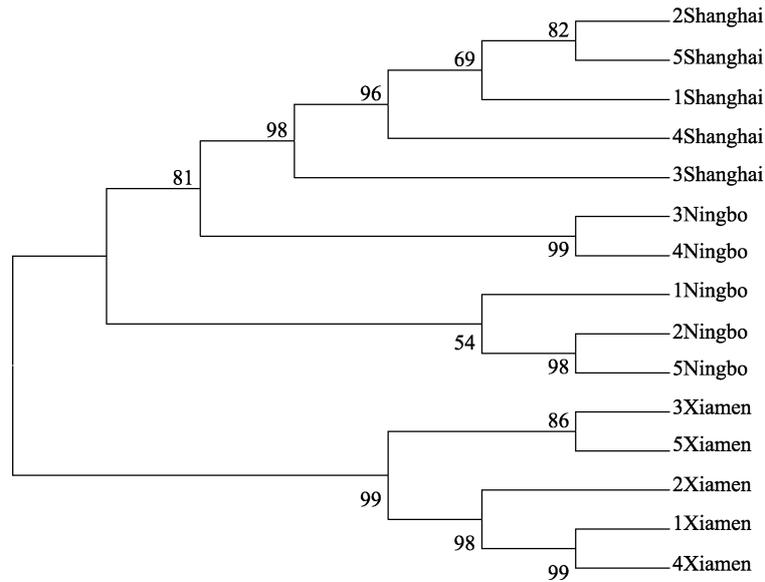


图 6 厚壳贻贝不同地理群体构建的进化树

1、2、3、4 和 5 表示不同地理群体中个体的编号。

Fig. 6 The phylogenetic tree of *Mytilus coruscus* from different geographical populations
1, 2, 3, 4 and 5 indicate the numbers of individuals in different geographical groups.

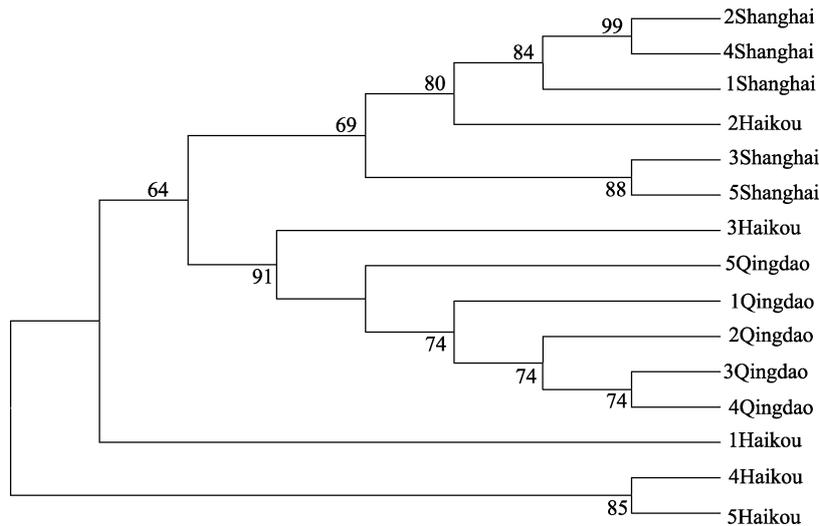


图 7 缢蛏不同地理群体构建的进化树

1、2、3、4 和 5 表示不同地理群体中个体的编号。

Fig. 7 The phylogenetic tree of *Sinonovacula constricta* from different geographical populations
1, 2, 3, 4 and 5 indicate the numbers of individuals in different geographical groups.

贝厦门群体单独聚为一支, 上海群体先聚为一支, 再与宁波群体聚在一起; 缢蛏青岛和上海群体分别聚为两支, 海口群体的 2 号个体与上海群体聚为一支, 3 号个体与青岛群体聚为一支。青蛤宁波群体聚为一支, 再与上海群体相聚, 最后与青岛群体相聚。所有这些结果表明, COI 基因基本能对同一物种不同地理群体进行聚类。

3 讨论

遗传多样性(genetic diversity)是生物所携带的遗传信息的总和, 是生态多样性和物种多样性的基础, 而物种多样性也就显示了基因遗传的多样性, 基因遗传多样性代表生物种群之内和种群之间的遗传结构的变异^[18-19]。DNA 碱基序列分析

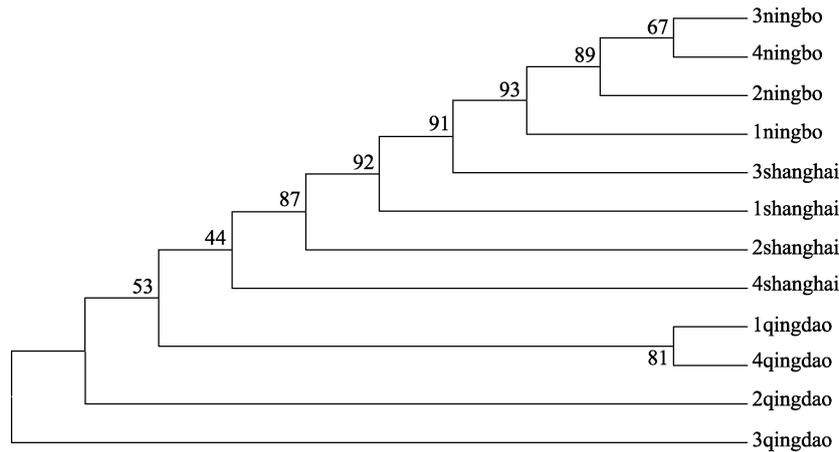


图 8 青蛤不同地理群体构建的进化树

1、2、3 和 4 表示不同地理群体中个体的编号。

Fig. 8 The phylogenetic tree of *Cyclina sinensis* from different geographical populations
1, 2, 3 and 4 indicate the numbers of individuals in different geographical groups.

可以准确的检测出遗传结构的变异(碱基互换、插入和缺失等)信息,可以准确地揭示种群间的进化关系,更准确地鉴别不同个体^[20-21]。DNA 条形码就是使用一段短 DNA 标准序列来实现物种鉴别的,线粒体基因因为没有内含子,不会发生等位基因重组现象,其遗传信息完全来自母本,因此比核基因更具优势,所以对动物而言,一般采用线粒体细胞色素 C 氧化酶 I 作为 DNA 条形码标准基因。据已有的报道,COI 基因序列对龙虾属^[22]和文蛤属^[24]等的分类鉴定具有一定的可行性。

由于贝类鉴别难度大,而且贝类幼体较小,发育过程中存在变态现象,更难用传统方法鉴定其物种信息,而条形码 DNA 序列分析能更好地解决这个问题。通过对上述 60 个物种的 COI 基因序列的总结研究,发现 COI 基因对贝类通用性较好,扩增效率高,方便各种贝类 COI 基因序列的获得,这为贝类物种的鉴定提供了先提条件;其次进化树中大多数物种聚类关系与传统分类一致,虽然腹足纲同目之间未能明显聚类,但这可能是由于整个研究物种跨度较大,导致截取的同源片段较少,从而导致其中包含的遗传信息有限,不足以区分所有的物种,或由于地理环境的不同,导致同一物种在表观形态上有一定的差异,使原始分类鉴定时不够准确,太平洋潜泥蛤未能明显聚类,原因还需要进一步研究。由不同地理群体聚类分析,同一地理群体基本能够聚在一起,之

后再与其他群体聚类,这可能由于长期的地理隔离,缺少基因交流,从而产生了一定的基因差异。但有的地理群体间存在群体交叉现象,此现象的原因可能为受到人为因素的干扰或距离较近未存在明显的遗传分化,如进口外来苗种培育时产生的幼苗逃逸而产生外来物种的污染,或在自然海区中存在基因交流。本研究推测魁蚶的胶南和统营群体存在交叉互换,可能由于该地魁蚶育种时所选的种贝同为韩国进口品种,而毛蚶的烟台威海群体存在群体交叉就可能由于两地距离较近未产生明显分化。上述情况出现的原因还需要进一步探究,虽然 COI 基因在鉴别同一物种不同地理群体间有一定的作用,但尚不能作为鉴别不同地理群体的依据。

对于 COI 基因的探索和分析已经有了很多的报道,如孟学平等^[25]发现 COI 基因可以鉴定福建西施舌,但不能鉴定其余群体;张迪等^[26]发现 COI 基因适于银鱼科鱼类物种鉴别和系统发育研究。但物种鉴定中的很多方面还处于初级阶段,仍有许多后续深入研究等待开展。一个基因序列没有变化在分类鉴别上是没有意义的,而快速变异的基因序列虽然在鉴定近源物种具有一定的优势,但其由于碱基的突变导致不能区分远源物种,COI 序列片段包含一定的变异速度相对较快的系统发育信息,因而可以用以探讨属级以下的系统发育关系,对低阶元的系统发育研究具有重要意

义。一个位点有 4 种碱基组成, 只需要 14 bp 的序列就可以产生 2.68 亿种组合方式, 虽然有些位点因为物种进化选择压力将会保持稳定, 但适当延长 DNA 片段长度便足以鉴别大多数物种。本研究需要进一步的总结分析, 发现其中的规律和特殊性, 为以后鉴别动物物种的种类和系统发育规律提供一定的依据, 从而探索更多的隐存种, 了解更多的遗传多样性。

参考文献:

- [1] Tautz D, Arctander P, Minelli A, et al. DNA points the way ahead in taxonomy[J]. *Nature*, 2002, 418(6897): 472-479.
- [2] Hebert P D N, Stoeckle M Y, Zemlak T S, et al. Identification of birds through DNA barcodes[J]. *PLoS Biology*, 2004, 2(10): 1657-1663.
- [3] Ward R D, Hanner R, Hebert P D N, et al. The campaign to DNA barcode all fishes[J]. *Fish Biology*, 2009, 74(2): 329-356.
- [4] Hebert P D N, Ratnas S, Waard J R, et al. Barcoding animal life: cytochrome oxidase subunit divergences among closely related species[J]. *Philosophical Transactions - Royal Society*, 2003, 270(1): 96-99.
- [5] Peng J L, Wang X Z, He S P, et al. The progress and application of DNA barcoding[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2008, 32(6): 916-919. [彭居俐, 王绪帆, 何舜平. DNA 条形码技术的研究进展及其应用[J]. *水生生物学报*, 2008, 32(6): 916-919.]
- [6] Chen J, Li Q, Kong L F, et al. CO I-based DNA barcoding in Tapetinae species (Mollusca, Bivalvia, Veneridae) along the coast of China[J]. *Zoological Research*, 2010, 31(4): 345-352. [陈军, 李琪, 孔令锋, 等. 基于 CO I 序列的 DNA 条形码在中国沿海缀锦蛤亚科贝类中的应用分析[J]. *动物学研究*, 2010, 31(4): 345-352.]
- [7] Wang L N, Yan X W, Qin Y J, et al. Research on the development of 16 kinds of economic shellfish DNA barcodes and molecular systems in China[J]. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2013, 28(5): 431-437. [王琳楠, 闫喜武, 秦艳杰, 等. 中国帘蛤目 16 种经济贝类 DNA 条形码及分子系统发育的研究[J]. *大连海洋大学学报*, 2013, 28(5): 431-437.]
- [8] Hou Y, Tian J T, Liu Z H, et al. Genetic diversity of the population of *Scapharca subcrenata* based on mitochondrial CO I gene[J]. *Marine Science*, 2016, 40(1): 1-9. [侯丫, 田吉腾, 刘志鸿, 等. 基于线粒体 CO I 基因的毛蚶群体遗传多样性[J]. *海洋科学*, 2016, 40(1): 1-9.]
- [9] Chen A H, Li Z X, Feng G N. Phylogenetic relationships of the genus *Meretrix* (Mollusca: Veneridae) based on mitochondrial COI gene sequences[J]. *Zoological Research*, 2009, 30(3): 233-239.
- [10] Zheng W J, Zhu S H, Shen X Q, et al. Genetic differentiation of *Tegillarca granosa* based on mitochondrial COI gene sequences[J]. *Zoological Research*, 2009, 30(1): 17-23. [郑文娟, 朱世华, 沈锡权, 等. 基于线粒体 COI 基因序列探讨泥蚶的遗传分化[J]. *动物学研究*, 2009, 30(1): 17-23.]
- [11] Meng W, Yang T Y, Hai S, et al. Study of DNA barcoding based on the mitochondrial COI gene sequences in *Salmo trutta fraio*[J]. *Chinese Journal of Fisheries*, 2010, 23(1): 6-10. [孟玮, 杨天燕, 海萨, 等. 基于线粒体 COI 基因序列的亚东鲑 DNA 条形码研究[J]. *水产学杂志*, 2010, 23(1): 6-10.]
- [12] Li Q, Zou S M, Zheng X D, et al. DNA barcode and its application in Marine life[J]. *Journal of Ocean University of China (Natural Science Edition)*, 2010, 40(8): 43-47. [李琪, 邹山梅, 郑小东, 等. DNA 条形码及其在海洋生物中的应用[J]. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2010, 40(8): 43-47.]
- [13] Ball S L, Armstrong K F. DNA barcodes for insect pest identification: a test case of tussock moths (Lepidoptera: Lymantriidae)[J]. *Canadian Journal of Forest Research*, 2006, 36(2): 337-350.
- [14] Yang X Q, Ye Q T, Xin T R, et al. Population genetic structure of *Cheyletus malaccensis* (Acari: Cheyletidae) in China based on mitochondrial COI and 12S rRNA genes[J]. *Experimental and Applied Acarology*, 2016, 69(2): 117-128.
- [15] Shen Y B, Li J L, Feng B B. Genetic analysis of cultured and wild populations of *Mytilus coruscus* based on mitochondrial DNA[J]. *Zoological Research*, 2009, 30(3): 240-246.
- [16] Feng Y W. DNA barcoding and molecular phylogeny of the Pteriina and Arcoida[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2012. [冯艳微. 珍珠贝亚目和蚶目 DNA 条形码与系统发生学研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2012.]
- [17] Chiesa S, Lucentini L, Freitas R, et al. A history of invasion: COI phylogeny of Manila clam *Ruditapes philippinarum* in Europe[J]. *Fisheries Research*, 2017, 186(1): 25-35.
- [18] Mona K, Oshaghi M A, Sedaghat M M, et al. Sequence analysis of mtDNA COI barcode region revealed three haplotypes within *Culex pipiens* assemblage[J]. *Experimental Parasitology*, 2017, 181: 102-110.
- [19] Alcock A L, Barratt I, Eleaume M, et al. Cryptic speciation and the circumpolarity debate: a case study on endemic Southern Ocean Octopuses using the COI barcode of life[J]. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 2010, 58(1): 242-249.
- [20] Zou S M. DNA barcoding and phylogeny of Neogastropoda[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2013. [邹山

- 梅. 新腹足目贝类 DNA 条形码系统构建及系统发育研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2013.]
- [21] Davison A, Rose I, Blackie E, et al. DNA barcoding of stylommatophoran land snails: a test of existing sequences[J]. *Molecular Ecology Resources*, 2009, 9(4): 1092-1101.
- [22] Liang H F, Xu X P, Huang Z J, et al. The molecular phylogeny on eight species of *Panulirus Genus* from the Chinese coast based on COI gene sequence[J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 2011, 50(6): 94-98. [梁华芳, 徐晓鹏, 黄志坚, 等. 中国沿海龙虾属 8 种龙虾 COI 基因序列的分子系统学研究[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2011, 50(6): 94-98.]
- [23] Chen A H, Li C X, Feng G N. Phylogenetic relationships of the genus *Meretrix* (Mollusca: Veneridae) based on mitochondrial COI gene sequences[J]. *Zoological Research*, 2009, 30(3): 233-239. [陈爱辉, 李朝霞, 封功能. 线粒体 COI、COII 和 CYTB 基因在鲍属物种鉴定中的适用性分析[J]. 动物学研究, 2009, 30(3): 233-239.]
- [24] Meng X P, Gao R C, Shen X, et al. DNA barcodes of clam *Coelomactata antiquata* (Bivalvia: Veneroida) in China based on COI gene[J]. *Fisheries Science*, 2011, 30(10): 627-630. [孟学平, 高如承, 申欣, 等. 基于 COI 的中国西施舌 DNA 条形码[J]. 水产科学, 2011, 30(10): 627-630.]
- [25] Zhang D, Lei G C, Gong C, et al. Genetic diversity of *Neosalanx taihuensis* based on mitochondrial COI sequences[J]. *Journal of Lake Sciences*, 2012, 24(2): 299-306. [张迪, 雷光春, 龚成, 等. 基于 COI 基因序列的太湖新银鱼遗传多样性[J]. 湖泊科学, 2012, 24(2): 299-306.]

Analysis of evolutionary relationships of important shellfish in China based on the DNA barcoding COI gene

ZHAO Qing^{1,3}, WU Biao^{1,2}, LIU Zhihong^{1,2}, LIU Hanmiao^{1,3}, SUN Xiujun^{1,2}, ZHOU Liqing^{1,2}, ZHANG Gaowei^{1,3}, YANG Aiguo^{1,2}

1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;
2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266273, China;
3. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: DNA barcodes can be used to identify existing biological groups and unknown biomaterials through shorter DNA sequences using polymerase chain reaction (PCR). The mitochondrial cytochrome oxidase I (COI) gene is one of the commonly used DNA barcoding genes. In the present study, to analyze the effectiveness of the COI gene for DNA barcoding in mollusk evolution, 353 sequences of 60 species belonging to 13 orders and 33 families were obtained by PCR amplification for clustering analysis. A neighbor-joining (NJ) phylogenetic tree was constructed by Mega, and the genetic evolution of seven species from different populations was also analyzed. The results showed that the universal primers of the COI gene were highly versatile for most shellfish. Although the amplification efficiency of primers in Pterioidea was only 10%, it reached 82.7% for the individuals. Except for the evolutionary status of eight species, such as *Scapharca broughtonii*, *Limnoperna fortunei*, and *Panopea abrupta*, the clustering relationships of other species were similar to results obtained using traditional methods. Based on the clustering analysis of 7 species from 26 geographical groups, it was found that the COI gene generally clustered the different geographical groups of the same species first, and some individuals in the population or group had clustering disorder. In conclusion, the COI gene could be applied to the identification and phylogenetic studies of shellfish species to a certain extent, which would enhance the role of the COI gene in practical applications of species identification, and provide reference data for the construction of shellfish DNA barcoding databases.

Key words: DNA barcoding; COI gene sequence; Mollusca; evolution

Corresponding author: LIU Zhihong. E-mail: liuzh@ysfri.ac.cn