

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2018.17338

基于线粒体 COI 序列的 DNA 条形码在中国海口足类物种鉴定中的应用分析

沙忠利^{1,2,3}, 王永良¹, 程娇^{1,2}

1. 中国科学院海洋研究所, 山东 青岛 266071;
2. 中国科学院大学, 北京 100049;
3. 中国科学院海洋大科学研究中心, 山东 青岛 266071

摘要: 中国海口足类动物区系具有丰富的物种多样性, 是我国海洋底栖生物中的重要经济类群。口足类的属内种间鉴别特征有的极为相似, 仅依靠传统的形态分类方法很难对近缘种和疑难种进行准确的鉴定。DNA 条形码技术可以弥补传统形态学鉴定的某些局限, 为物种鉴定提供了有效的工具。该研究探讨了利用线粒体 COI 序列对中国海口足类进行物种鉴定的可行性, 共获得口足目 4 总科 6 科 24 属 38 个种的 204 条线粒体 COI 序列, 与 GenBank 收录的 14 种 42 条口足类同源序列进行比对, 结果显示口足类 COI 基因不存在碱基插入缺失现象, 碱基组成偏倚明显, A+T 含量(63.5%)显著高于 G+C 含量(36.5%)。基于 Kimura 双参数模型计算遗传距离, 结果显示遗传距离随着分类阶元的增高而增大。同物种内个体间的遗传距离变化范围在 0%~3.91%, 平均值为 0.76%。同属内各物种间的遗传距离变化范围为 6.55%~18.99%, 平均值为 12.91%。同科内不同属间的遗传距离变化范围为 9.16%~23.32%, 平均值为 16.89%。不同科间的遗传距离变化范围为 16.52%~26.6%, 平均值为 21.31%。由此可见, 口足类 COI 基因的种间和种内遗传距离存在明显的间隙。基于 COI 序列构建的口足类邻接关系树显示所有包含大于 1 个个体的物种均可形成单系群, 且节点支持率均为 100%。本研究证明了 COI 序列作为 DNA 条形码标准基因在口足类物种鉴定中的有效性。此外, 研究发现中国沿海分布的口虾蛄可能至少存在两个隐存种, 实证了基于 COI 序列的 DNA 条形码技术能够用于口虾蛄隐存多样性的探究。

关键词: 口足类; COI 基因; DNA 条形码; 物种鉴定; 隐存种

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2018)04-0858-09

口足类(Stomatopoda)是一类形态结构很特殊的高等甲壳动物, 属于软甲纲(Malacostraca)内三个亚纲中形态构造最为独特的掠虾亚纲(Hoplocarida), 其体躯分节格局和附肢结构以及生态习性与软甲纲其他类群有显著差异, 在海洋甲壳动物的系统进化上占有重要地位^[1]。掠虾亚纲中仅有口足目 1 目, 现生种超 450 种, 分隶于 7 总科 17 科^[2]。中国海口足类动物区系具有丰富的物种多样性, 目前已记录有 6 总科 12 科 42 属 104 种^[3], 约占世界已知种数的 1/4。由于 20 世纪 90

年代我国近海的主要经济鱼类资源持续衰退, 桁杆拖网作业得到逐步发展, 部分口足类物种作为资源量大、经济价值较高的渔业资源逐渐被利用, 特别是口虾蛄 *Oratosquilla oratoria* (De Haan, 1844)在渤海、黄海、东海近岸海域拖网的渔获物中占主要优势^[4-5]。口足类可根据其掠肢形态分为 2 类: 一类是掠肢指节具数个尖的矛刺而成为高效捕食者的“矛刺型”(spearers), 主要栖息于浅海泥沙底质; 而另外一类是掠肢基部形成击锤状的“锤击型”(smashers)^[6], 锤式掠肢适于捕食珊瑚礁

收稿日期: 2017-09-18; 修订日期: 2018-05-21.

基金项目: 科技部科技基础性工作专项(2013FY110700, 2014FY110500); 国家自然科学基金项目(31401955).

作者简介: 沙忠利, 研究员, 博士, 研究方向为发育生物学. E-mail: shazl@qdio.ac.cn

通信作者: 程娇(1986-), 女, 副研究员, 博士, 研究方向为海洋甲壳动物分类与系统发育. E-mail: jcheng@qdio.ac.cn

等硬底质环境中常见的蟹类和软体动物。口足类成体和幼体间的形态差异较大, 而同一属内各物种成体间的鉴别特征有的极为相似, 这使得口足类物种鉴定十分困难, 因此仅依靠传统的形态分类方法很难对口足类近缘种和疑难种进行准确的鉴定^[1]。DNA 分类方法的发展, 能够从不同角度填补传统分类的不足或解决一些传统分类无法入手的难题。大量的研究表明线粒体细胞色素 c 氧化酶(COI)5'端区域可作为动物物种识别的标准基因并得到广泛应用^[7]。目前, 常用的 DNA 条形码(DNA barcoding)分析方法有两种: 距离法(distance-based method)和单系法(monophyly-based method)^[7]。距离法主要是根据物种种间和种内的遗传差异, 检测是否存在条形码间隙(barcoding gap); 单系法则是通过构建进化树来判断各物种之间是否互为单系群(monophyletic group)^[8]。尽管 DNA 条形码技术在实际应用方面存在争议, 然而因为其便捷可行, 且与传统形态分类方法结合能够提高物种鉴定的速度和准确性, 加快新物种和隐存种的发现^[9-11], 受到国际学术界的广泛重视。

DNA 条形码已经在海洋甲壳动物分类和隐存多样性研究中得到成功应用^[12-15], 但是国内尚未有将线粒体 COI 基因应用于口足类条形码研究的相关报道。本研究分析了中国沿海 4 总科 6 科 24 属 38 种口足类 204 个个体的线粒体 COI 序列, 与 GenBank 收录的 14 种 42 条口足类同源序列进行比对, 拟解决以下问题: (1) 所研究的口足类 COI 序列之间是否存在条形码间隙; (2) 口足类不同种类之间是否在系统树上互为单系群; (3) 基于线粒体 COI 序列的 DNA 条形码对口足类进行物种鉴定和隐存种发掘是否具有可行性。

1 材料与方 法

1.1 实验材料与 DNA 提取

用于本研究的 204 个口足类样品均为中国科学院海洋生物标本馆馆藏标本, 所有样品经王永良研究员形态学鉴定后, 共包括口足目 4 总科 6 科 24 属 38 种(表 1), 其中长叉三宅虾蛄 *Miyakea nepa* (Latreille in Latreille, Le Peletier, Serville & Guérin, 1828)、断脊小口虾蛄 *Oratosquillina interrupta* (Kemp, 1911)、口虾蛄样品含不同的地理

群体。按照酚/氯仿提取法从肌肉组织中提取基因组 DNA。

1.2 PCR 扩增、纯化及序列测定

线粒体 COI 基因的 PCR 扩增引物为无脊椎动物 DNA 条形码通用引物 LCO1490 (5'-GGTCA-ACAAATCATAAAGATATTGG-3') 和 HCO2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3')^[16]。PCR 采用 25 μ L 反应体系, 含 10 mmol/L Tris, pH 8.3, 50 mmol/L KCl, 1.5 mmol/L MgCl₂, dNTP 200 μ mol/L, 上下游引物各 200 nmol/L, Taq DNA 聚合酶(TaKaRa) 1.25 U, DNA 模版 10~100 ng, 最后加灭菌蒸馏水至 25 μ L。PCR 反应条件参照引物出处的参考文献^[16]。每组 PCR 反应均设阴性对照以检测是否存在 DNA 污染。

取 PCR 扩增产物 2 μ L 用 1.5%的琼脂糖凝胶电泳进行检测后, 选取扩增良好的样品进行纯化回收。产物回收时用 2%的琼脂糖凝胶, 150 V 电压电泳, 用 Axygen DNA 凝胶回收试剂盒进行回收和纯化, 回收的具体步骤参照试剂盒说明书。将回收纯化后的 PCR 产物送至英潍捷基(上海)有限公司用 ABIPRISM3730XL DNA Analyzer 测序仪进行正反向测序。

1.3 数据分析

测序原始序列由 DNASTAR (DNASTAR, Madison, WI, USA)软件包进行编辑、比对和排序, 最后辅以人工校对。从 GenBank 中下载了口足类线粒体 COI 序列 14 种 42 条(具体信息如表 1 所示), 经 MEGA v6.06^[17]软件中内置的 Muscle 多序列比对程序比对后截取同源序列。利用 ARLEQUIN v3.5^[18]软件计算分子多样性参数如多态位点个数、转换颠换比例和插入缺失位点数等。利用 Kimura 双参数模型(Kimura-2-parameter, K2P)^[19]计算序列间的遗传距离。基于 K2P 模型, 以叶虾蛄(*Dahlella caldariensis* DCU92670)作为外群, 采用邻接法(neighbour-joining, NJ)构建系统发育树, 进行 1000 次自展分支检验。遗传距离的计算和系统发育树的构建均在 MEGA v6.06^[17]软件中完成。

2 结果与分析

2.1 序列特征分析

研究所用引物位于 COI 基因 5'端, 成功扩增

表 1 本研究中口足类的线粒体 COI 序列信息
 Tab. 1 Information for mitochondrial COI sequences of stomatopods in this study

		分类地位 taxonomy		样品数 sample size	序列号 accession No.
总科 superfamily	科 family	属 genus	种 species		
虾蛄总科 Squilloidea	虾蛄科 Squillidae	近虾蛄属	条尾近虾蛄 <i>Anchisquilla fasciata</i>	3	本研究, FJ229760
		<i>Anchisquilla</i>			
		牛虾蛄属 <i>Busquilla</i>	方尾牛虾蛄 <i>Busquilla quadraticauda</i>	1	本研究
		脊虾蛄属	多脊虾蛄 <i>Carinosquilla multicarinata</i>	1	本研究
		<i>Carinosquilla</i>			
		绿虾蛄属 <i>Clorida</i>	孟买绿虾蛄 <i>Clorida bombayensis</i>	1	本研究
			施尾绿虾蛄 <i>Clorida decorata</i>	5	本研究, FJ229761–FJ229763
		小绿虾蛄属	疣尾小绿虾蛄 <i>Cloridina verrucosa</i>	2	本研究
		<i>Cloridina</i>			
		拟绿虾蛄属	蝎形拟绿虾蛄 <i>Cloridopsis scorpio</i>	3	本研究
		<i>Cloridopsis</i>			
		纹虾蛄属	窝纹虾蛄 <i>Dictyosquilla foveolata</i>	8	本研究, FJ229764–FJ229767
		<i>Dictyosquilla</i>			
		平虾蛄属	伍氏平虾蛄 <i>Erugosquilla woodmasoni</i>	6	本研究, FJ229768, FJ229769
		<i>Erugosquilla</i>			
		猛虾蛄属	眼斑猛虾蛄 <i>Harpiosquilla annandalei</i>	4	本研究
		<i>Harpiosquilla</i>	猛虾蛄 <i>Harpiosquilla harpax</i>	8	本研究, FJ229770–FJ229774
			日本猛虾蛄 <i>Harpiosquilla japonica</i>	2	本研究
		糙虾蛄属 <i>Kempina</i>	尖尾糙虾蛄 <i>Kempina mikado</i>	2	本研究, HM138792
		滑虾蛄属 <i>Lenisquilla</i>	窄额滑虾蛄 <i>Lenisquilla lata</i>	3	本研究
		光虾蛄属 <i>Levisquilla</i>	无刺光虾蛄 <i>Levisquilla inermis</i>	2	本研究
		褶虾蛄属	脊条褶虾蛄 <i>Lophosquilla costata</i>	1	本研究
		<i>Lophosquilla</i>	窄额褶虾蛄 <i>Lophosquilla tiwarii</i>	3	本研究
		三宅虾蛄属 <i>Miyakea</i>	长叉三宅虾蛄 <i>Miyakea nepa</i>	24	本研究, FJ229775–FJ229781
		口虾蛄属	黑斑口虾蛄 <i>Oratosquilla kempii</i>	4	本研究
		<i>Oratosquilla</i>	口虾蛄 <i>Oratosquilla oratoria</i>	72	本研究
		小口虾蛄属	断脊小口虾蛄	22	本研究, FJ229788–FJ229796
		<i>Oratosquillina</i>	无刺小口虾蛄 <i>Oratosquillina inonata</i>	9	本研究
			北方小口虾蛄 <i>Oratosquillina nordica</i>	4	本研究
			前刺小口虾蛄 <i>Oratosquillina perpensa</i>	14	本研究
东方虾蛄属	屈足东方虾蛄 <i>Quollastria gonypetes</i>	5	本研究		
<i>Quollastria</i>	东亚东方虾蛄 <i>Quollastria imperialis</i>	1	本研究		
	装饰东方虾蛄 <i>Quollastria ornata</i>	5	本研究		
拟虾蛄属 <i>Squilloides</i>	瘦拟虾蛄 <i>Squilloides leptosquilla</i>	2	本研究, KR095170		
宽虾蛄总科 Eurysquilloidea	宽虾蛄科 Eurysquillidae	华虾蛄属	华虾蛄 <i>Sinosquilla sinica</i>	1	本研究
<i>Sinosquilla</i>					
指虾蛄总科 Gonodactyloidea	指虾蛄科 Gonodactylidae	独指虾蛄属	三线独指虾蛄	2	本研究
		<i>Gonodactylaceus</i>	<i>Gonodactylaceus ternatensis</i>		
		小指虾蛄属	绿色小指虾蛄 <i>Gonodactylellus viridis</i>	4	本研究, AF205224, DQ440604
		<i>Gonodactylellus</i>			
		指虾蛄属	大指虾蛄 <i>Gonodactylus chiragra</i>	3	本研究, AF205250, HM138785
		<i>Gonodactylus</i>	宽体指虾蛄 <i>Gonodactylus platysoma</i>	3	本研究, AF205237, HM138787
			窄脊指虾蛄 <i>Gonodactylus smithii</i>	5	本研究
			脊尾齿指虾蛄	3	本研究
	齿指虾蛄科 Odontodactylidae	齿指虾蛄属	<i>Odontodactylus cultrifer</i>		
	假虾蛄科 Pseudosquillidae	假虾蛄属	多毛假虾蛄 <i>Pseudosquilla ciliata</i>	4	本研究, AF205245, AY947836, HM138800
仿虾蛄总科 Parasquilloidea	仿虾蛄科 Parasquillidae	芳虾蛄属 <i>Faughnia</i>	韩氏芳虾蛄 <i>Faughnia haani</i>	3	本研究
			塞仁芳虾蛄 <i>Faughnia serenei</i>	1	本研究

出口足类 38 种 204 条 COI 序列, 长度均为 658 bp。将实验获得的 COI 序列与 GenBank 下载序列进行多序列比对, 最终获得 246 条 COI 同源序列, 长度为 550 bp。通过序列比对检测到多态位点 223 个, 其中包含简约信息位点 217 个, 同时发现核苷酸替换 417 处, 其中颠换 122 处, 转换 295 处, 不存在插入/缺失。

口足类 COI 序列的平均碱基组成分别为 T 35.1%、C 18.2%、A 28.4%、G 18.4%, 碱基组成偏倚明显, A+T 含量(63.5%)显著高于 G+C 含量(36.5%)。密码子三个位置的碱基组成也呈反 GC 偏倚, 其中第 1 位密码子 GC 碱基平均含量最高, 达 47.3%; 第 2 位密码子次之, 平均含量为 42.6%; 第 3 位密码子最小, 平均含量仅为 19.6%(表 2)。

表 2 38 种口足类 246 个个体的 COI 基因部分序列中碱基平均分布频率
Tab. 2 Average nucleotide frequencies of COI partial sequences of 38 stomatopod species %

碱基 base	总频率 frequency	密码子第 1 位点 1 st site of codon	密码子第 2 位点 2 nd site of codon	密码子第 3 位点 3 rd site of codon
T	35.1	22.0	44.0	39.0
C	18.2	16.7	25.1	12.6
A	28.4	30.3	13.1	41.8
G	18.4	30.6	17.5	7.0

2.2 距离法分析结果

DNA 条形码间隙的存在依赖于种内遗传差异要远小于种间差异。本研究发现种内最大遗传距离发生在口虾蛄内, 高达 3.91%, 远高于种内平均遗传距离(0.76%), 分析可能存在隐存种(详见第 3.1 节)。图 1 和表 3 显示了基于 Kimura 双参数模型计算的口足目不同分类水平的 COI 序列距离, 结果显示遗传距离随着分类阶元的增高而

增大。同物种种内个体间的遗传距离变化范围在 0%~3.91%, 平均值为 0.76%。同属内各物种间的遗传距离变化范围在 6.55%~18.99%, 平均值为 12.91%。同科内不同属间的遗传距离变化范围在 9.16%~23.32%, 平均值为 16.89%。不同科间的遗传距离变化范围在 16.52%~26.6%, 平均值为 21.31%。由此可见, 口足类 COI 基因的种间和种内遗传距离存在明显的间隙。

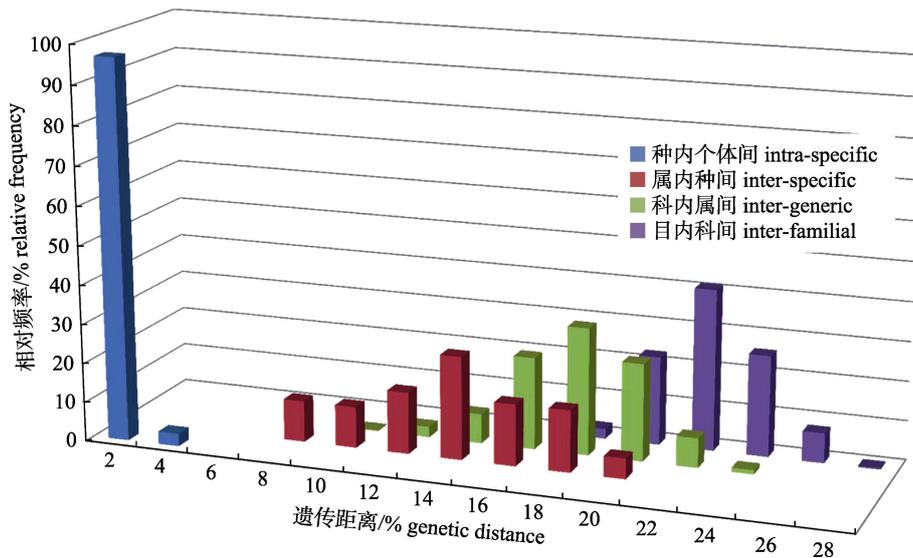


图 1 基于 K2P 参数模型分析的口足目 COI 遗传距离分布情况

Fig. 1 Distribution of genetic divergences based on K2P model for COI sequences of stomatopods

表 3 口足目内不同分类水平的 COI 遗传距离
Tab. 3 Genetic distances according to different taxonomic levels within Stomatopoda for COI sequences

组间比较 comparison	平均值/% average	最小值/% minimum	最大值/% maximum	标准误差 standard error
种内个体间 within species	0.76	0	3.91	0.024
属内种间 within genus, between species	12.91	6.55	18.99	0.179
科内属间 within family, between genera	16.89	9.16	23.32	0.006
目内科间 within order, between families	21.31	16.52	26.6	0.006

2.3 单系法分析结果

基于线粒体 COI 序列构建的口足类邻接关系树(图 2)显示所有包含大于 1 个个体的物种均可形成单系群,且节点支持率均为 100%。口虾蛄所有个体聚为一支,但存在两个高度分化的支系,并且具有很高的支持度(99%),推测口虾蛄至少包含两个隐存的分类单元。此外,在邻接关系树上还发现一些与传统形态分类不一致的现象,如虾蛄科口虾蛄属的黑斑口虾蛄 *Oratosquilla kempii* (Schmitt, 1931)并未与同属的口虾蛄聚为一支,而与长叉三宅虾蛄聚在一起;屈足东方虾蛄 *Quollastris gonypetes* (Kemp, 1911)没有聚在东方虾蛄属的分支内,而与脊条褶虾蛄 *Lophosquilla costata* (de Haan, 1844)聚在一起;在科级水平,齿指虾蛄科的代表物种脊尾齿指虾蛄 *Odontodactylus cultrifer* (White, 1850)与指虾蛄科种类发生聚类。

3 讨论

3.1 口虾蛄隐存多样性

由于门类繁多及生态习性的特殊性,很多海洋生物类群中都存在一些形态上极其相似但在生殖上已发生隔离的隐存种。随着 DNA 分类方法的发展和应用,物种隐存多样性越来越多地被发现,这也提示科研人员需要对目前的海洋生物多样性状况进行重新审视。在许多海洋甲壳动物中发现了隐存种,这一现象在口足类中也有报道^[20-21]。Barber 等^[20]对印度-太平洋海域的指虾蛄总科 67 个种的 COI 序列进行了分析,发现所研究的 327 个个体中,物种鉴定准确率高达 96.5%,并发现 5 个种类存在隐存种。同时,Barber 等^[21]利用线粒体 COI 基因分子标记,发现分布在珊瑚礁三角区的 3 种同域分布且生态习性相似的口足类在系统发生树上均显示为 3 个分支。尽管各分支在地理分

布上存在部分重叠,但有限的基因交流暗示各分支之间应已发生生殖隔离,进而推断这 3 种口足类应至少各包含 3 个隐存种。同时结合其他证据,笔者认为珊瑚礁三角区的物种多样性很可能被低估。

口虾蛄是我国重要的海洋经济动物之一,在沿海广泛分布,由于营穴居生活且不作长距离迁移^[22],通常表现出较高的遗传分化水平,因而可能包含隐存的分类单元。本研究发现不同地理群体的口虾蛄聚为两个高度分化的支系,并且两支系内个体的分布范围存在明显的地理差异:支系 A 为南方组群,包括东海和南海群体;支系 B 为北方组群,包括渤海和黄海群体,南北组群的地理分布以长江口为界。进一步研究发现,两个支系间的 COI 序列遗传距离(5.6%)要比支系内的平均遗传距离(0.43%和 0.72%)大很多,这与在口足类其他种类中发现的隐存种间的遗传差异水平相似(如 *Haptosquilla pulchella*: 2.9%~6.6%; *Haptosquilla glyptocercus*: 4.7%~11.7%; *Gonodactylus viridis*: 3.0%~10.6%)^[21]。鉴于此,基于 COI 序列的 DNA 条形码技术能够用于口虾蛄隐存多样性的探究,且研究表明中国沿海分布的口虾蛄可能至少存在两个隐存种,但仍需扩大采样范围,并结合核基因及形态信息进一步验证。

3.2 DNA 条形码物种鉴定

DNA 条形码技术作为一种快速有效的物种鉴定工具在海洋生物分类中得到了广泛的应用。距离法和单系法是常用的 DNA 条形码分析方法,相关研究也已证实了其在物种鉴定、挖掘物种隐存多样性和发现新物种等方面的有效性^[10, 23-24]。本研究利用这两种方法对基于线粒体 COI 序列的 DNA 条形码在口足类物种鉴定中是否具有可行性进行了探究。Hebert 等^[10]提出利用 COI 基因序

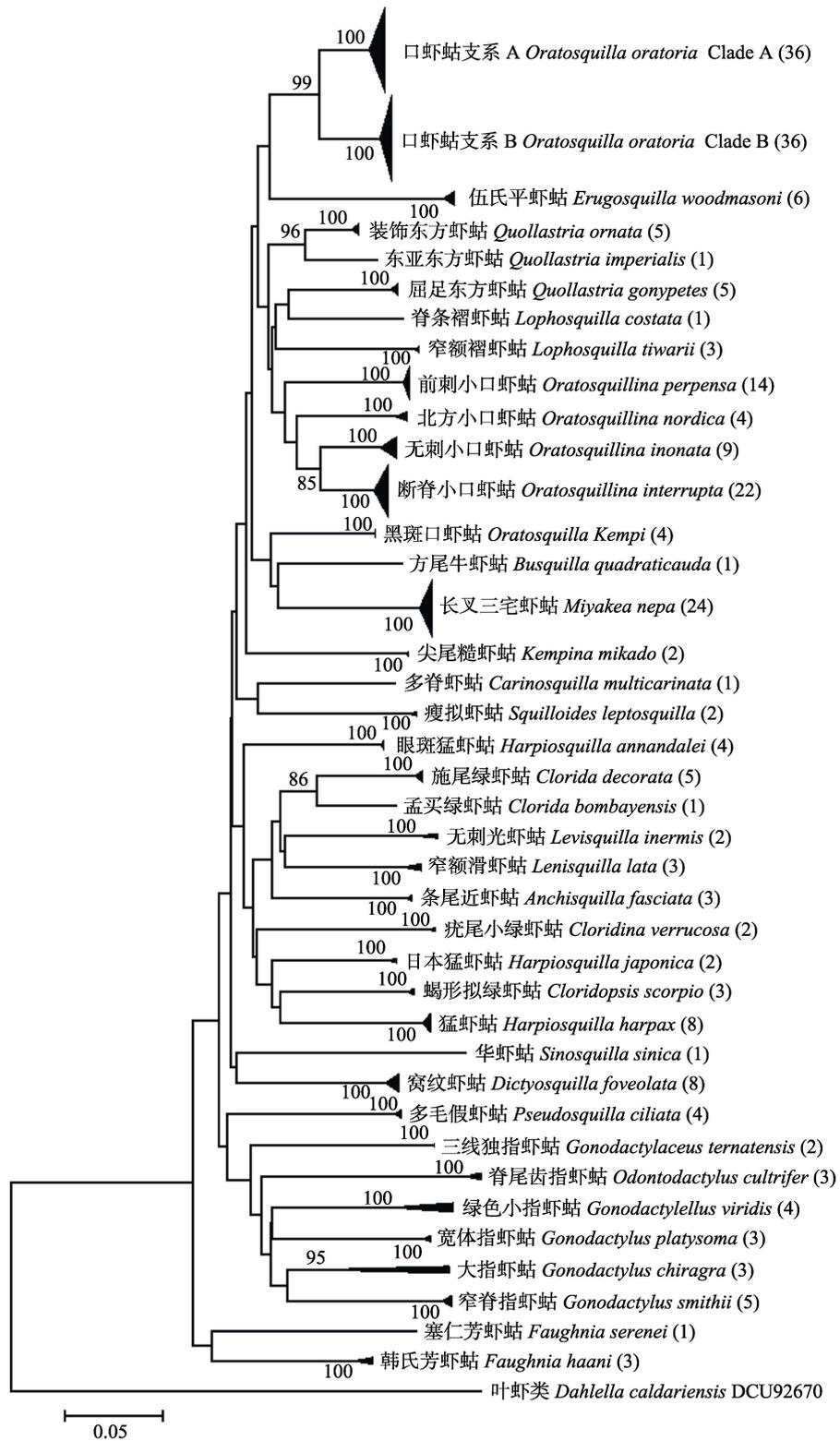


图 2 基于线粒体 COI 序列构建的口足目邻接关系树

分支上的数字表示检验重复 1000 次后所得的 >50% 的支持率, 标尺代表遗传距离单位为 0.05/百万年, 括号内的数字表示每个物种的个体数。

Fig. 2 Neighbour-joining tree based on 246 COI sequences belonging to Stomatopoda. Bootstrap support (>50%) in 1000 replications is shown adjacent to each internode. Scale represents the genetic distance of 0.05/million years. Numbers in parentheses indicate the total sample size for each species.

列鉴别物种的 10 倍法则, 即种内与种间的标准差异阈值应该为种内平均遗传距离的 10 倍。在本研究中, 种内个体间的 COI 序列遗传差异最大值为 3.91%, 而平均值仅为 0.76%; 属内不同种间 COI 序列差异最小值为 6.55%, 平均值为 12.91%。由此可见, 口足类种内与种间遗传距离存在条形码间隙, 种间平均遗传距离是种内平均遗传距离的 17 倍, 证明 DNA 条形码距离分析法可以用于口足类的物种鉴定。

随着采样规模的扩大, 一些生物类群的种内遗传差异会显著提高, 而种间遗传差异也会因分化时间较短的姐妹种的存在而降低, 导致物种种内与种间遗传差异出现重叠区域^[24-25]。此外, 不同物种的线粒体 DNA 碱基替换率差异很大, 也会导致种内和种间序列距离的重叠, 进而影响种内和种间差异阈值的界定^[26-27]。在这种情况下, 基于系统发生的单系分析法被认为是替代距离分析法进行物种鉴定的一种有效的条形码分析方法。本研究中, 在由 246 条口足类 COI 序列构建的邻接关系树上, 所有包含大于 1 个个体的物种皆为单系, 不同种类能够被明显区分。鉴于此, 基于系统发生的单系分析法能够对口足类物种进行有效鉴定。

口足类的属内种间鉴别特征有的十分相似, 仅一些细微的外部形态特征被用于近缘种的分类学研究。例如, 小口虾蛄属中的前刺小口虾蛄 *Oratosquilla perpersa* (Kemp, 1911) 和无刺小口虾蛄 *Oratosquilla inornata* (Tate, 1883) 间的外部形态极为相似, 仅可通过额角长宽比例或局部刺的有无来区分。因此, 通过传统形态分类学的方法对这些近缘种进行鉴定十分困难, DNA 条形码技术的出现为口足类疑难种及易混淆种类的界定提供了可能。本研究发现无刺小口虾蛄与前刺小口虾蛄 COI 遗传距离较大, 高达 12.6%, 种内遗传距离仅为 0.91% 和 0.15%; 从系统树的分布来看, 小口虾蛄属的种类聚在同一分支中, 无刺小口虾蛄先与断脊小口虾蛄聚类, 再与北方小口虾蛄 [*Oratosquilla nordica* (Ahyong & Chan, 2008)]、前刺小口虾蛄聚为一支。鉴于上述分析, 无刺小口虾蛄与前刺小口虾蛄尽管外部形态差异细微,

但属于同属两个不同种。由此可见, 在形态学研究的基础上, DNA 条形码应用于口足类分类学研究将大大提高物种鉴定的准确性和速度, 证实了 COI 基因作为 DNA 条形码标准基因在口足类物种鉴定中的有效性。

本研究中出现了基于 DNA 条形码的分子分类结果与形态学的分类单元划分不一致的现象, 推测可能是由单分子标记系统发育信息不足或形态特征不可靠等原因引起, 需要加大采样密度, 结合核基因分析和形态学分析对口足类的分类系统进行重新修订。尽管如此, 距离法和单系法两种 DNA 条形码分析方法相互印证, 证实了将 COI 基因作为 DNA 条形码标准基因在口足类物种鉴定和隐存种挖掘方面是可行的。

参考文献:

- [1] Cheng J, Wang Y L, Sha Z L. Progress on the systematics of Stomatopoda (Crustacea: Malacostraca)[J]. Marine Sciences, 2015, 39(12): 173-177. [程娇, 王永良, 沙忠利. 口足目系统分类学研究进展[J]. 海洋科学, 2015, 39(12): 173-177.]
- [2] Ahyong S T. Revision of the Australian Stomatopod Crustacea[M]. Records of the Australian Museum, 2001: 1-326.
- [3] Liu R Y. Checklist of Marine Biota of China Seas[M]. Beijing: Science Press, 2008. [刘瑞玉. 中国海洋生物名录[M]. 北京: 科学出版社, 2008.]
- [4] Gu D X, Liu M L. Analysis on the population structure and abundance of *Oratosquilla oratoria* in Tianjin sea area[J]. Hebei Fisheries, 2011(8): 24-26. [谷德贤, 刘茂利. 天津海域口虾蛄群体结构及资源量分析[J]. 河北渔业, 2011(8): 24-26.]
- [5] Yu C G, Chen Q Z, Chen X Q, et al. Species composition and quantity profile of mantis shrimp around Zhoushan fishing ground[J]. Journal of Dalian Ocean University, 2011, 26(2): 153-156. [俞存根, 陈全震, 陈小庆, 等. 舟山渔场及邻近海域虾蛄类的种类组成和数量分布[J]. 大连海洋大学学报, 2011, 26(2): 153-156.]
- [6] Caldwell R L, Dingle H. Stomatopods[J]. Scientific American, 1976, 234(1): 80-89.
- [7] Hebert P D N, Cywinska A, Ball S L, et al. Biological identifications through DNA barcodes[J]. Proceedings: Biological Sciences, 2003, 270(1512): 313-321.
- [8] Toffoli D, Hrbek T, Araújo M L G, et al. A test of the utility of DNA barcoding in the radiation of the freshwater stingray genus *Potamotrygon* (Potamotrygonidae, Myliobatiformes)[J]. Genetics and Molecular Biology, 2008, 31(1): 324-336.

- [9] Ni L H, Li Q, Kong L F. DNA barcoding and phylogeny in the family Mactridae (Bivalvia: Heterodonta): evidence for cryptic species[J]. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2012, 44: 164-172.
- [10] Hebert P D N, Ratnasingham S, de Waard J R. Barcoding animal life: cytochrome *c* oxidase subunit I divergences among closely related species[J]. *Proceedings: Biological Sciences*, 2003, 270: S96-S99.
- [11] Xiao J H, Xiao H, Huang D W. DNA barcoding: new approach of biological taxonomy[J]. *Acta Zoologica Sinica*, 2004, 50(5): 852-855. [肖金花, 肖晖, 黄大卫. 生物分类学的新动向 DNA 条形码[J]. *动物学报*, 2004, 50(5): 852-855.]
- [12] Yuan S, An J M, Sha Z L. DNA taxonomy of Balanidae[J]. *Marine Sciences*, 2012, 36(9): 82-88. [原帅, 安建梅, 沙忠利. 藤壶科 DNA 分类研究[J]. *海洋科学*, 2012, 36(9): 82-88.]
- [13] Costa F O, de Waard J R, Boutillier J, et al. Biological identifications through DNA barcodes: the case of the Crustacea[J]. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2007, 64(2): 272-295.
- [14] Radulovici A E, Sainte-Marie B, Dufresne F. DNA barcoding of marine crustaceans from the Estuary and Gulf of St Lawrence: a regional-scale approach[J]. *Molecular Ecology Resources*, 2009, 9(s1): 181-187.
- [15] Wu T H, Tsang L M, Chan B K K, et al. Cryptic diversity and phylogeography of the island associated barnacle *Chthamalus moro* in Asia[J]. *Marine Ecology*, 2015, 36(3): 368-378.
- [16] Folmer O, Black M, Hoeh W, et al. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit I form diverse metazoan invertebrates[J]. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 1994, 3(5): 294-299.
- [17] Tamura K, Stecher G, Peterson D, et al. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2013, 30(12): 2725-2729.
- [18] Excofer L, Lischer H E L. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows[J]. *Molecular Ecology Resources*, 2010, 10(3): 564-567.
- [19] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment[J]. *Briefings in Bioinformatics*, 2004, 5(2): 150-163.
- [20] Barber P, Boyce S L. Estimating diversity of Indo-Pacific coral reef stomatopods through DNA barcoding of stomatopod larvae[J]. *Proceedings: Biological Sciences*, 2006, 273(1597): 2053-2061.
- [21] Barber P H, Erdmann M V, Palumbi S R. Comparative phylogeography of three codistributed stomatopods: origins and timing of regional lineage diversification in the Coral Triangle[J]. *Evolution*, 2006, 60(9): 1825-1839.
- [22] Wu Y Q, Zhang B L. Ecology of the economic invertebrates in the Bohai sea[J]. *Marine Sciences*, 1990(2): 48-52. [吴耀泉, 张宝琳. 渤海经济无脊椎动物生态特点的研究[J]. *海洋科学*, 1990(2): 48-52.]
- [23] Hebert P D N, Stoeckle M Y, Zemplak T S, et al. Identification of birds through DNA barcodes[J]. *PLoS Biology*, 2004, 2(10): e312.
- [24] 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.]
- [25] Meyer C P, Paulay G. DNA barcoding: error rates based on comprehensive sampling[J]. *PLoS Biology*, 2005, 3(12): e422.
- [26] Will K W, Rubinoff D. Myth of the molecule: DNA barcodes for species can not replace morphology for identification and classification[J]. *Cladistics*, 2004, 20: 47-55.
- [27] Rubinoff D, Cameron S, Will K. A genomic perspective on the shortcomings of mitochondrial DNA for "barcoding" identification[J]. *Journal of Heredity*, 2006, 97(6): 581-594.

Application of mitochondrial COI-based DNA barcoding for the identification of stomatopod species (Crustacea, Stomatopoda) in the China seas

SHA Zhongli^{1,2,3}, WANG Yongliang¹, CHENG Jiao^{1,2}

1. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China;

2. University of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;

3. Center for Ocean Mega-Science, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China

Abstract: Commonly known as mantis shrimps, stomatopods are commercially valuable and taxonomically diverse. In spite of high species diversity, stomatopod species exhibit subtle morphological differences, which make species identification a difficult task based on taxonomic keys alone. DNA barcoding has been proposed as a promising tool for species identification and discovery in a wide range of animal taxa. In this study, the performance of DNA barcoding in delineating stomatopod species in the China seas was assessed. The nucleotide sequences of mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit-I (COI) gene were obtained from 204 individuals of 38 stomatopod species in 24 genera in a wide phylogenetic range. These 204 sequences were compared with the other 42 homologous sequences from 14 species of Stomatopoda retrieved from GenBank. Sequence comparisons revealed 223 polymorphic sites, 217 of which were parsimony informative, and no InDels were found. The COI sequences showed a strong AT bias (63.5%) in nucleotide composition. As expected, the mean Kimura-2-parameter (K2P) genetic divergence increased with an increase in the taxonomic rank. The pairwise genetic divergences among conspecific individuals ranged from 0% to 3.91%, with a mean of 0.76%. The mean K2P pairwise divergence between individuals of congeneric species was 12.91%, ranging from 6.55% to 18.99%. The mean K2P pairwise divergence between individuals of different genera that belong to the same family was 16.89% (range 9.16%–23.32%), and mean K2P pairwise divergence between individuals of different stomatopod families was 21.31% (range 16.52%–26.6%). Thus, an obvious “barcoding gap” was found between intraspecific and interspecific divergences of COI sequences within Stomatopoda. The neighbor-joining phylogenetic tree reconstructed by COI sequences recovered most species as monophyletic with high bootstrap support, except for the species represented by a single individual. In addition, two reciprocally monophyletic, highly supported lineages together with large inter-lineage relative to intra-lineage divergences recovered from COI data concur in suggesting the existence of two possible cryptic species in *Oratosquilla oratoria* (De Haan, 1844). These results demonstrate the effectiveness of mitochondrial COI-based DNA barcoding for species identification and cryptic discovery in stomatopods.

Key words: Stomatopoda; COI gene; DNA barcoding; species identification; cryptic discovery

Corresponding author: CHENG Jiao. E-mail: jcheng@qdio.ac.cn