

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2018.17358

## 不同 DNA 条形码基因在帘蛤目贝类分类鉴定中的比较分析

吴彪<sup>1,2</sup>, 赵庆<sup>1,3</sup>, 刘寒苗<sup>1,3</sup>, 刘志鸿<sup>1,2</sup>, 孙秀俊<sup>1,2</sup>, 孙超<sup>4</sup>, 周丽青<sup>1,2</sup>, 杨爱国<sup>1,2</sup>

1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室, 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;
4. 烟台市水产研究所, 山东 烟台 264000

**摘要:** DNA 条形码基因已经广泛应用在海洋贝类的分类鉴定、系统发育进化、种群遗传分析等领域的研究。为进一步研究评估不同 DNA 条形码基因在海洋贝类鉴定中的作用, 本研究利用从 GenBank 数据库随机下载的帘蛤目 COI、16S rRNA、18S rRNA 和 28S rRNA 基因序列, 通过传统距离法和单系聚类法结合分析, 比较了上述 DNA 条形码基因在鉴定物种及系统发育进化中的鉴定效率, 并以本实验室已获得的部分贝类 DNA 序列进行了验证。结果表明, 根据“10 倍法则”和“2%”阈值标准, 本研究中 COI 能够鉴定 57.1%物种, 16S rRNA 能够鉴定 60.9%, 18S rRNA 鉴定 16.7%, 而 28S rRNA 无法有效鉴定; 多数种 COI 和 16S rRNA 基因序列的种间遗传距离和种内遗传距离存在“条形码间隙”, 而 18S rRNA 和 28S rRNA 序列的种间和种内的遗传距离存在显著重叠, 没有明显“条形码间隙”; 聚类分析结果表明, 基于 COI 基因序列, 87.9%的个体与同种聚为单系, 以 16S rRNA 序列, 65.6%的个体与同种聚为单系, 未聚成单系的个体则形成姐妹系, 未出现不同种聚为单系现象, 能够呈现与形态分类基本一致的系统发生关系; 但 18S rRNA 和 28S rRNA 呈现的聚类关系相对混乱。相对而言, 在鉴定帘蛤目物种时, COI 和 16S rRNA 都能够作为条形码基因, 且 COI 有效性更高, 18S rRNA 和 28S rRNA 基因由于种内变异较大, 不适于作为条码基因。研究结果为科学选用 DNA 条形码基因进行帘蛤目贝类的鉴定提供了参考资料。

**关键词:** DNA 条形码; 帘蛤目; 比较分析; 有效性

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2018)04-0880-11

软体动物是动物界中仅次于节肢动物的第二大门类, 其种类达 10 万余, 在生态系统中具有重要作用和地位。贝类是重要的软体动物, 根据身体构造不同, 通常将贝类种类划分为 7 个纲<sup>[1]</sup>。但由于贝类种类繁多, 分类标准不同, 导致现有一些物种的分类存有分歧, 许多近缘种、新发现物种的鉴定存在困难。进行物种鉴定和分类, 是开展其他相关生物学科学研究的基本条件<sup>[2]</sup>。

传统分类方法仍是目前开展物种鉴定和系统分类工作的主要手段, 这种方法主要是依靠形态特征、生态特征、解剖特征作为判定依据。不过,

贝类具有其特殊性, 且种类较多, 存在很多近缘种, 其形态特征和生态特征十分相似<sup>[2-3]</sup>。而且, 一些特征可能随着环境(或发育阶段)变化而改变, 如双壳贝类幼虫发育具有一个变态过程, 在变态前的很长一段时期内, 不同贝类的 D 形幼虫在形态、生态特征等方面基本无明显差异, 很难以此辨别物种<sup>[4]</sup>。在这些情况下, 传统分类方法就存在明显的局限性, 无法进行准确鉴定和系统进化等方面的研究。基于 PCR 扩增技术的 DNA 条形码 (DNA barcoding) 技术一经提出, 得到了许多学者的认可, 在物种鉴定、系统分类、遗传分析等研

收稿日期: 2017-09-30; 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: 吴彪(1982-), 男, 副研究员, 从事贝类遗传育种与繁育研究. E-mail: wubiao@ysfri.ac.cn

通信作者: 刘志鸿, 研究员, 从事贝类种质资源与遗传育种研究. E-mail: liuzh@ysfri.ac.cn

究中发挥了重要作用<sup>[5-6]</sup>。生物条形码协会将其定义为: 通过 PCR 扩增和测序来获得一段标准同源序列(约 800 bp), 再将序列进行多重序列比对和聚类分析, 从而将某一个物种准确地归为某一特定的类群中。经过十多年的发展, DNA 条形码技术不仅应用在哺乳类等许多陆生动植物中, 在海洋生物中的鱼类、甲壳类、贝类、藻类等重要经济动植物上也得到广泛应用<sup>[7-11]</sup>。在软体动物中, 双壳类、腹足类和头足类的 DNA 条形码的相关报道较多<sup>[12]</sup>。动物 DNA 条形码基因研究中, 由于线粒体 DNA 与核基因相比具有母系遗传, 以及无内含子、重组率低等特点备受关注, 其中 COI 基因应用相对较多。不过除了 COI 基因, 12S rRNA、16S rRNA 以及核糖体 18S rRNA、28S rRNA 和 ITS 等其他基因也被许多学者应用, 作为 DNA 条形码在不同物种鉴定和发育进化等方面发挥了重要作用<sup>[5, 13-14]</sup>。

为进一步明确不同 DNA 条形码基因在贝类物种鉴定和系统进化研究中的作用, 本研究从 GenBank 数据库中下载一批帘蛤目基因序列, 结合传统距离法和聚类法, 比较分析了线粒体基因 COI、16S rRNA 和核糖体基因 18S rRNA、28S rRNA 4 个 DNA 条形码基因的鉴定和聚类效果, 并用课题组收集的部分帘蛤目样品序列进行验证, 以期为进一步筛选帘蛤目贝类 DNA 条形码标准基因提供参考数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品来源及序列来源

以帘蛤目不同科、属、种的个体序列进行分析, 序列从 GenBank 数据库中随机下载。验证序列来源于本实验室已经建立的海洋贝类 DNA 条形码数据库, 根据构建系统进化树所用物种随机选用文蛤(*Meretrix meretrix*)、短文蛤(*Meretrix petechialis*)、四角蛤蜊(*Macra veneriformis*)和中国蛤蜊(*Macra chinensis*)进行 COI 系统进化树验证, 用波纹巴非蛤(*Paphia undulata*)、琴文蛤(*Meretrix lyrata*)、文蛤和短文蛤进行 16S rRNA 系统进化树验证。验证样品已经过分类专家通过形态学特征进行种类鉴定。所用每个物种的个体数

目在 1~11 之间。本研究中共用 72 个物种的 269 条序列, 具体信息见表 1。

### 1.2 DNA 提取与序列扩增、测序

样品 DNA 提取方法参照吴彪等<sup>[15]</sup>的方法进行, 具体操作为: 将活体解剖, 取闭壳肌约 100 mg 放入盛有 475  $\mu$ L 抽提缓冲液(Tris-HCl 10 mmol/L, pH 8.0; EDTA 10 mmol/L, pH 8.0)的 1.5 mL 离心管中, 剪碎组织, 加入 25  $\mu$ L SDS (10%) 和 5  $\mu$ L 蛋白酶 K (20 mg/L), 在 55 $^{\circ}$ C 水浴中消化至澄清, 用酚: 氯仿: 异戊醇(25: 24: 1)抽提两次, 离心 10 min (12000 rpm), 重复一次该步骤; 上清用等体积抽提 10 min, 离心 10 min (12000 rpm), 取上清, 加入 1/25 上清体积的 5 mol/L NaCl 溶液和 2 倍体积预冷的无水乙醇, 出现絮状沉淀, 12000 rpm 离心 10 min; 沉淀用 70% 的乙醇洗涤 2~3 次后, 风干; 加入 100  $\mu$ L TE (Tris-HCl 10 mmol/L, pH 8.0; EDTA 0.1 mmol/L, pH 8.0)溶解, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

扩增 COI 和 16S rRNA 基因序列用于验证, 反应在 Eppendorf PCR 仪上进行, 反应体系为 25  $\mu$ L, 包括 ddH<sub>2</sub>O 16.8  $\mu$ L, 正反向引物各 1  $\mu$ L, 模板 DNA 1  $\mu$ L, Taq 酶 0.2  $\mu$ L, dNTP 2.5  $\mu$ L, buffer 2.5  $\mu$ L。反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。PCR 产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测。PCR 引物序列分别为: COI 基因, F: GGTCAACAAATCATAAAGATAT-TGG, R: TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAAT-CA; 16S rRNA 基因, F: CGCCTGTTTATCAA-AAACAT, R: CCGGTCTGAACTCAGATCACGT。目的条带送上海生工测序。

### 1.3 数据分析

实验所得条带经过正反向测序, 用 DNASTar 软件中的 Seqman 进行拼接, 并根据测序图谱人工手动校正碱基。用 Clustal X 软件对所有序列进行多重比对, 校正后去除两端冗余序列。利用 MEGA 6.0 软件基于 K2P (Kimura 2-parameter) 双参数替代模型分别计算 COI、16S rRNA、18S rRNA、28S rRNA 基因序列同属内的种内和种间遗传距离, 结合 10 倍法则和 2% 阈值判断能否鉴定物种, 采用邻接法(neighbor-joining, NJ)构建分

子进化树, 进行 1000 次自展检验(bootstraps)检测置信度, 分析依据不同基因而形成的系统进化树。

## 2 结果与分析

### 2.1 基于传统距离法的分析结果

运用 MEGA 软件基于 K2P 双参数模型计算了四个条形码基因在种分类阶元的遗传距离, 同属种间遗传距离、种内遗传距离等信息详见表 1。结果表明, 对于 COI 基因, 7 属 18 个物种中的 4 个物种序列数为 1 条, 没有种内遗传距离的计算值, 其他种内遗传距离范围为 0~0.208, 种间遗传距离范围为 0.02~0.38, 种内遗传距离平均值范围为 0~0.109, 种间遗传距离平均值范围 0.03~0.20; 基于 16S rRNA 基因序列的 6 属 23 个物种, 种内遗传距离范围、种间遗传距离范围、种内遗传距离平均值范围、种间遗传距离平均值范围分别为 0~0.066、0.009~0.148、0~0.045 和 0.03~0.102; 18S rRNA 基因序列共有 5 属 16 个物种, 以上四个值范围分别为 0~1.51、0.02~1.41、0.01~1.27、0.07~1.181; 28S rRNA 基因序列分析中共有 5 属 15 个物种, 四个值范围分别为 0.001~1.33、0.24~2.19、0.51~1.33、0.29~1.53。根据 Hebert 等<sup>[16]</sup>提出的 10 倍法则, 以及 2% 标准阈值为评价标准, COI 序列中, 有 8 个种内遗传距离小于 2% 阈值, 同时其 10 倍值也小于种间遗传距离, 占 57.1%; 16S rRNA 中有 14 个物种满足该标准, 占 60.9%; 18S rRNA 中有 2 个物种, 占 16.7%; 而 28S rRNA 则没有满足该标准的物种。从遗传距离范围值还可以看出, 16S rRNA 和 COI 的种内种间遗传距离普遍小于 18S rRNA 和 28S rRNA, 且 16S rRNA 的遗传距离普遍小于 COI, 说明 16S rRNA 相对保守, 且这两种基因的保守性要高于 18S rRNA 和 28S rRNA。16S rRNA 和 COI 基因, 除个别属内的物种外, 大多数物种的种间遗传距离大于种内遗传距离, 即存在明显的“条形码间隙”, 但 18S rRNA 和 28S rRNA 变异性大, 很多属的种内遗传距离超过了种间遗传距离, 重叠现象明显, 种内与种间之间没有显著的“条形码间隙”存在。

### 2.2 基于单系法的分析结果

运用 K2P 模型中的邻接法, 分别构建了 COI、

16S rRNA、18S rRNA、28S rRNA 系统发育树, 并分别选取腹足目的相应基因序列为外群, 重复抽样 1000 次对各分支的置信度进行检验, 结果如图 1~图 4 所示。基于 COI 基因序列的 NJ 进化树表明, 29 个个体与同物种个体聚成单系, 占 87.9%; 未能聚在一起的 2 个短文蛤和 1 个日本镜蛤 (*Dosinia japonica*) 也都与同物种聚为姐妹系, 所有帘蛤目个体聚为一个单系与作为外群的腹足目朝鲜花冠小月螺 (*Lunella coronata coreensis*) 最终聚类, 聚类结果与形态学分类基本一致; 4 个验证个体中 3 个聚到了同物种单系内, 1 个与同属物种聚类。以 16S rRNA 构建的 NJ 树表明, 除验证用的琴文蛤 (*M. lyrata*) 和外群东方白舟螺 (*Crepidula plana*) 聚成一个单系外, 其他所有同属的物种均各自聚为一支, 有 21 个个体聚为单系, 占 65.6%。4 个验证个体中 2 个聚到了同物种单系内, 1 个聚到同属物种, 1 个则未聚类到同属物种。不过, 聚类树形还表明文蛤属 (除琴文蛤) 显示出与鸟蛤属、剑蛭属等其他几个属相对远的距离, 在外群东方白舟螺存在时文蛤属未能与帘蛤目内的其他系群先聚类。相对而言, 18S rRNA 和 28S rRNA 的 NJ 树形图显示的聚类关系与形态分类关系相差较大, 尤其是 28S rRNA 聚类关系比较混乱, 出现了同物种不形成单系、不同种类却聚成单系的情况, 形态种被分割, 而且外群个体未形成帘蛤目以外的单独系群, 这说明一些物种 18S rRNA 和 28S rRNA 序列的种内遗传距离可能大于种间遗传距离, 运用 18S rRNA 和 28S rRNA 不能很好地对帘蛤目进行系统进化研究, 其结果可能与形态分类相差较远。

## 3 讨论

相对规范的 DNA 条形码概念由 Hebert 等<sup>[17]</sup>提出, 其核心内容是利用生物体的一段短的基因序列将未知个体鉴定。作为一种公共数据资源, DNA 条形码基因需要具备几个特点: 首先, 片段长度要适中, 且有相对保守的区域用来设计通用性强的引物, 以便于 PCR 扩增; 而且需要丰富的遗传变异, 具有一定的分化度, 但种内差异又要小, 能够有效区分不同物种; 除此之外, 片段还

表 1 本研究帘蛤目 72 种贝类 DNA 条形码基因信息  
 Tab. 1 Information of COI, 16S rRNA, 18S rRNA, 28S rRNA genes of 72 species from Veneroidea used in this study

条形码基因 barcoding	科 family	属 genus	种 species	序列数 sequence number	GenBank 序列号 GenBank accession no.	种间遗传距离 genetic dis- tance pairwise- species	种间遗传 距离平均值 average genetic distance pairw- ise: species	种内遗传距离 genetic dis- tance within species	种内遗传 距离平均值 average gen- etic distance within species	
COI 基因	砗磲科 Tridacnidae	砗磲属 <i>Tridacna</i>	磷砗磲 <i>T. squamosa</i>	1	KJ202117.1	0.10-0.38	0.16	N	N	
			大砗磲 <i>T. gigas</i>	3	KJ202113.1/KJ202115.1/KJ202116.1		0.005-0.009	N	0.07	
			无磷砗磲 <i>T. deras</i>	1	KJ202112.1		N	N		
	蛤蚶科 Mactridae	蛤蚶属 <i>Mactra</i>	番红砗磲 <i>T. crocea</i>	7	KJ202111.1/KJ202110.1/KJ202108.1/KJ202107.1/A B076920.1/HM188391.1/HM188370.1		0.07-0.029	0.14	0.002-0.020	0.019
			四角蛤蚶 <i>M. veneriformis</i>	11	AY874531.1/GQ864249.1/GQ864248.1/GQ864247.1/ GQ864246.1/GQ864245.1/GQ864244.1/GQ864243. 1/GQ864242.1/GQ864241.1/GQ864240.1	0.14		0.002-0.020	0.008	
			中国蛤蚶 <i>M. chinensis</i>	3	EU118000.1/KC205926.1/JN674634.1		0.003-0.012	0.008		
			薄片镜蛤 <i>D. corrugate</i>	4	AY874528.1/HQ703147.1/HM124573.1/JN898932.1	0.11-0.22	0.2	0.01-0.01	0.01	
帘蛤科 Veneridae	镜蛤属 <i>Dosinia</i>	饼干镜蛤 <i>D. biscocia</i>	2	HM124577.1/HM124572.1		0.008	0.008			
		射带镜蛤 <i>D. troscheli</i>	2	HQ703140.1/HM124576.1		0.005	0.002			
		短文蛤 <i>M. petechialis</i>	7	AB280785.1/AY874530.1/JX503043.1/HM124583.1/ JQ294059.1/HQ703173.1/HQ703170.1	0.08	0.08	0.005-0.081	0.035		
	文蛤属 <i>Meretrix</i>	文蛤 <i>M. meretrix</i>	7	DQ399402.1/KP976276.1/FJ434678.1/KJ657769.1/J F700173.1/JN043623.1/JX676161.1		0.02-0.21	0.11	0.002-0.013	0.012	
		多形饰贝 <i>D. polymorpha</i>	5	JX099437.1/U47653.1/KX537632.1/AF474404.1/HM 210081.1			0.002-0.008	0.004		
		<i>D. bugensis</i>	2	U47650.1/U47651.1		0.007-0.208	0.109			
		<i>D. presbensis</i>	1	HM210026.1		N	N			
饰贝科 Dreissenidae	硬壳蚶属 <i>Geloina</i>	红树蚶 <i>G. expansa</i>	2	AB722090.1/AB498812.1		0.003-0.007	0.005			
		河蚶 <i>C. fluminea</i>	4	KU906087.1/KU906067.1/KU906036.1/KU905760.1	0.02-0.06	0.03	0.001-0.003	0.002		
		日本蚶 <i>C. japonica</i>	2	AB722043.1/AB722042.1		N	N			
鸟尾蛤科 Cardiidae	脊鸟蛤属 <i>Fragum</i>	脊鸟蛤 <i>F. fragum</i>	5	KR422917.1/KR422916.1/EU733095.1/EU733094.1/ EU733093.1	0.063-0.148	0.088	0-0.007	0.006		
		班氏脊鸟蛤 <i>F. lochooanum</i>	5	EU733070.1/EU733071.1/		0-0.017	0.011			
		洁脊鸟蛤 <i>F. mundum</i>	4	EU733069.1/EU733068.1/EU733067.1		0-0.006	0.005			
	莓实脊鸟蛤 <i>F. unedo</i>	莓实脊鸟蛤 <i>F. unedo</i>	3	EU733075.1/EU733076.1/EU733077.1/EU733102.1 EU733073.1/EU733074.1/KC429318.1		0-0.016	0.011			

(待续 to be continued)

(续表 1 Tab.1 continued)

条形码 基因 barcoding	科 family	属 genus	种 species	序列数 sequence number	GenBank 序列号 GenBank accession no.	种间遗传距离 genetic dis- tance pairwise- species	种间遗传 距离平均 distance pair- wise: species	种内遗传距离 genetic dis- tance within species	种内遗传 距离平均 average gen- etic distance within species
		薄壳鸟蛤属 <i>Fulvia</i>	<i>F. colorata</i>	3	KR422934.1/KR422933.1/KR422932.1	0.060-0.105	0.076	0-0.026	0.017
			<i>F. dulcis</i>	3	KR422936.1/KR422935.1/KR422937.1			0.004-0.008	0.006
			<i>F. mienkeae</i>	3	KR422945.1/KR422944.1/KR422949.1			0.002	0.002
	灯塔蛤科 Pharidae	剑蛭属 <i>Ensis</i>	大西洋剑蛭 <i>E. directus</i>	5	KR078013.1/HF970449.1/HF970448.1/HF970447.1/HF970446.1	0.01-0.05	0.03	0-0.01	0.001
			小剑蛭 <i>E. minor</i>	5	HF970498.1/HF970497.1/HF970496.1/HF970494.1/HF970493.1			0	0
			大剑蛭 <i>E. siliqua</i>	5	AJ586470.1/AJ586469.1/AJ586468.1/AJ586467.1/AJ586466.1			0.002-0.016	0.006
			纽芬兰剑蛭 <i>E. terranovensis</i>	5	HF970515.1/HF970514.1/HF970513.1/HF970512.1/HF970511.1			0.002	0.001
	球蚶科 Sphaeriidae	球蚶属 <i>Sphaerium</i>	<i>S. corneum</i>	5	GU128635.1/GU128634.1/GU128633.1/GU128632.1/GU128631.1	0.009-0.052	0.032	0.004	0.004
			<i>S. nucleus</i>	5	HM208273.1/HM208272.1/HM208271.1/HM208270.1/HM208269.1			0.025	0.025
			<i>S. rivicola</i>	4	HM014170.1/HM014169.1/HM014168.1/HM014171.1			0	0
			<i>S. solidum</i>	5	FJ874909.1/FJ874908.1/FJ874907.1/FJ874906.1/FJ874905.1			0.002-0.006	0.003
			<i>S. striatinum</i>	5	AF152045.1/AF152044.1/AF152043.1/AF152042.1/AF152041.1			0.002-0.02	0.009
	帘蛤科 Veneridae	文蛤属 <i>Meretrix</i>	丽文蛤 <i>M. lusoria</i>	3	JN969940.1/JN969939.1/DQ356374.1	0.013-0.137	0.102	0.002-0.005	0.003
			琴文蛤 <i>M. lyrata</i>	3	HM124707.1/HM124706.1/AJ548769.1			0.007-0.016	0.01
			文蛤 <i>M. meretrix</i>	4	JN969955.1/JN969954.1/DQ356373.1/AM085108.1			0.01-0.02	0.01
			短文蛤 <i>M. petechialis</i>	3	HM124709.1/HM124710.1/HM124708.1			0.004-0.066	0.045
			和葛巴非蛤 <i>P. amabilis</i>	3	HM124711.1/HM124712.1/HM124716.1	0.057-0.106	0.076	0-0.01	0.01
			锯齿巴非蛤 <i>P. gallus</i>	5	JQ277765.1/JQ277764.1/JQ277763.1/JQ277762.1/JQ277761.1			0-0.03	0.01
			波纹巴非蛤 <i>P. undulata</i>	5	JN969937.1/JN969936.1/AJ548767.1/KP252992.1/JQ277768.1			0	0
18S rRNA 基因	帘蛤科 Veneridae	巴非蛤属 <i>Paphia</i>	波纹巴非蛤 <i>P. undulata</i>	4	JN996750.1/EU660735.1/JQ277784.1/JN996787.1	0.87-1.40	1.181	1.08-1.51	1.27
			织锦巴非蛤 <i>P. textile</i>	3	JN996749.1/JN996748.1/JN996786.1			0-1.04	0.69
			巴非蛤 <i>P. papilionacea</i>	2	JN996747.1/JN996785.1			1	1
			和葛巴非蛤 <i>P. amabilis</i>	2	JN996746.1/JN996784.1			1.3	1.3

(待续 to be continued)

(续表 1 Tab.1 continued)

条形码基因 barcoding	科 family	属 genus	种 species	序列数 sequence number	GenBank 序列号 GenBank accession no.	种间遗传距离 genetic dis- tance pairwise: specie	种间遗传距离 average genetic distance pairw- ise: specie	种内遗传距离 genetic dis- tance within specie	种内遗传 距离平均值 average gen- etic distance within specie
		文蛤属 <i>Meretrix</i>	<i>M. lyrata</i>	2	JN996741.1/JN996771.1	0.47-1.41	0.86	0.98	0.98
			<i>M. lusoria</i>	3	JN996740.1/JN996734.1/JN996769.1			0.98	0.98
			<i>M. casta</i>	2	KC416613.1/KJ546371.1			1.08	1.08
			<i>M. lamarkii</i>	1	DQ389107.1			N	N
	砗磲科	砗磲属	<i>T. derasa</i>	3	JX975005.1/JX975006.1/JX975003.1	0.08	0.07	0.01-0.08	0.06
	Tridacnidae		<i>T. maxima</i>	3	JX974999.1/JX974986.1/JX974969.1			0-0.2	0.13
	蛤蚶科	蛤蚶属	<i>M. corallina</i>	3	KT966792.1/KT966776.1/KT966775.1	1.02	0.83	0.01-0.76	0.39
	Macridae		<i>M. stultiorum</i>	1	KJ193781.1			N	N
	灯塔蛤科	剑蛭属	<i>E. siliqua</i>	1	EU660777.1	0.02-1.08	0.49	N	N
	Pharidae		<i>E. americana</i>	1	EU660775.1			N	N
			<i>E. macha</i>	3	AM933630.1/AM933629.1/AM933628.1			0.01-0.03	0.02
			<i>E. directus</i>	3	AM933622.1/AM933619.1/AM933615.1			0.01	0.01
28S rRNA 基因	帘蛤科 Veneridae	巴非蛤属 <i>Paphia</i>	<i>P. undulata</i>	3	JQ277802.1/JN996787.1/JN996788.1	0.88	0.88	0.004-1.08	0.72
			<i>P. sinuosa</i>	1	JQ277801.1			N	N
		蛤仔属 <i>Ruditapes</i>	<i>R. variegatus</i>	1	DQ343858.1	1.24-1.59	1.53	N	N
			<i>R. philippinarum</i>	3	AM779742.1/HE965785.1/AF378647.1			0.001-1.29	0.86
			<i>R. decussatus</i>	2	HE965783.1/DQ184781.1			0.88	0.88
	樱蛤科 Tellinidae	亮樱蛤属 <i>Nitidotellina</i>	<i>N. hokkaidoensis</i>	2	AB746887.1/AB751341.1	0.24-0.31	0.29	1.02	1.02
			<i>N. iridella</i>	2	AB746886.1/AB751340.1			1.31	1.31
			<i>N. minuta</i>	1	AB751343.1			N	N
		明樱蛤属 <i>Moerella</i>	<i>M. rutila</i>	2	AB751334.1/AB746880.1	1.08-2.19	1.42	1.29	1.29
			<i>M. nishimurai</i>	2	AB746879.1/AB751333.1			1.2	1.2
			<i>M. iridescens</i>	5	JN645247.1/JN645248.1/JN645246.1/JN645245.1/A B751330.1			0.005-0.77	0.51
			<i>M. jedoensis</i>	1	AB105365.1			N	N
		白樱蛤属 <i>Macoma</i>	<i>M. incongrua</i>	2	AB746901.1/AB751355.1	0.87-0.90	0.95	1.13	1.13
			<i>M. contabulata</i>	2	AB746899.1/AB751353.1			1.33	1.33
			<i>M. nasuta</i>	1	AM779701.1			N	N

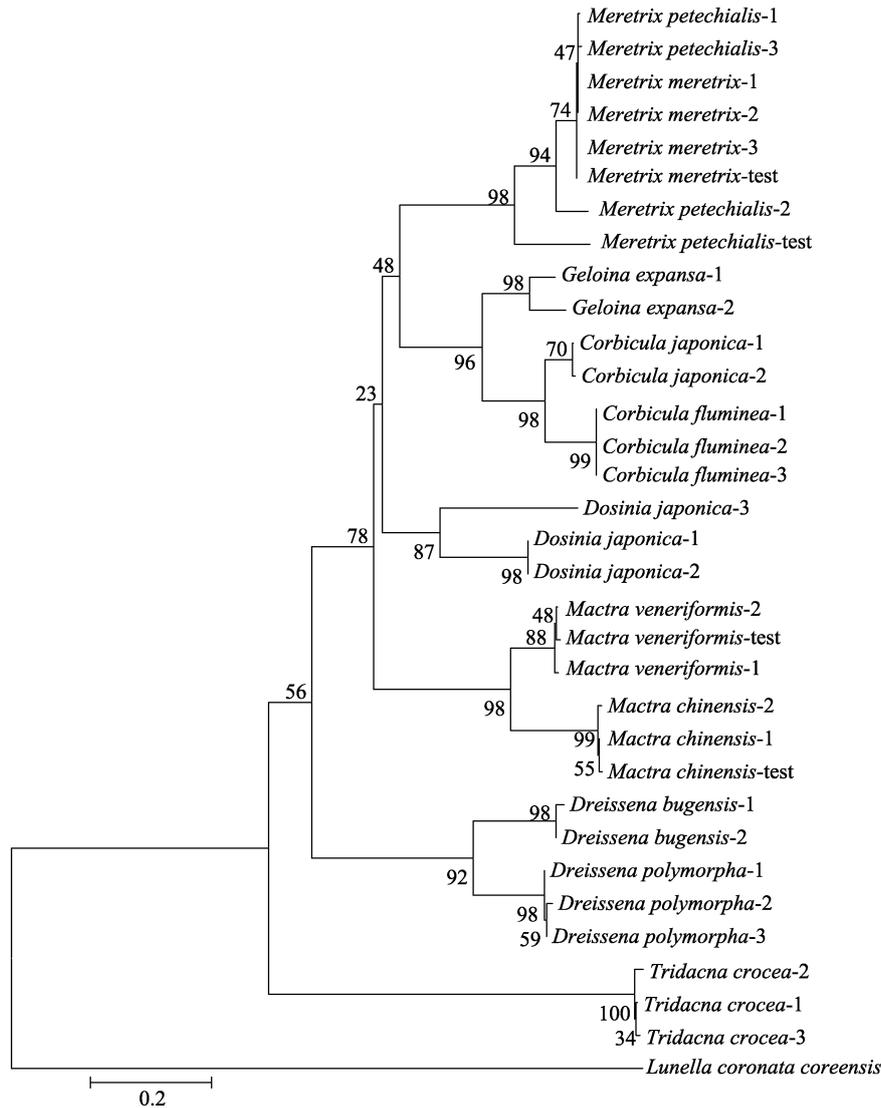


图 1 帘蛤目基于 COI 基因序列的 NJ 分子系统树

Fig. 1 NJ tree resulting from analysis of COI gene data of species in Veneroida

需能够尽可能地兼顾不同的分类群。这些看似矛盾又有统一性的标准,在不同的分类阶元层次上需要一个平衡。本研究中的 COI、16S rRNA 两个线粒体基因是在动物的物种鉴定、系统分类工作中常被选用的基因<sup>[10, 18-19]</sup>, 18S rRNA、28S rRNA 两个核糖体基因也有一些报道<sup>[20-21]</sup>, 但常作为辅助工具, 使用相对较少。而植物中常用的有 matK、rbcL 和 ITS 等, 这些不同的基因片段在不同分类阶元系统进化研究中各有优缺点。目前, 针对同一分类阶元内不同基因片段的比较研究较少。

目前已有的报道中, DNA 条形码数据的计算方法有多种, 学者提出的分析模型也有很多,

但总体上可分为基于树形和基于序列特征两种方法。于贞贞<sup>[22]</sup>利用樱蛤总科的 COI 和 16S rRNA 评估了传统距离法、条形码间隙自动检索法 (ABGD)、单系法、混合耶鲁模型法 (GMYC) 和特征分析法 (CAOS) 在鉴定科、属、种不同分类水平上的有效性, 认为 CAOS 可能是鉴定物种效率最好、适应性最广的方法, 不过 ABGD 法和单系法在初期鉴定物种时具有优势。本研究所用的传统距离法和聚类法均属于树形 DNA 条形码方法, 这也是目前研究使用频率最高的常用方法。

在传统距离法中, DNA 条形码能够区分鉴定物种的准确性有赖于种间差异与种内差异的间隔,

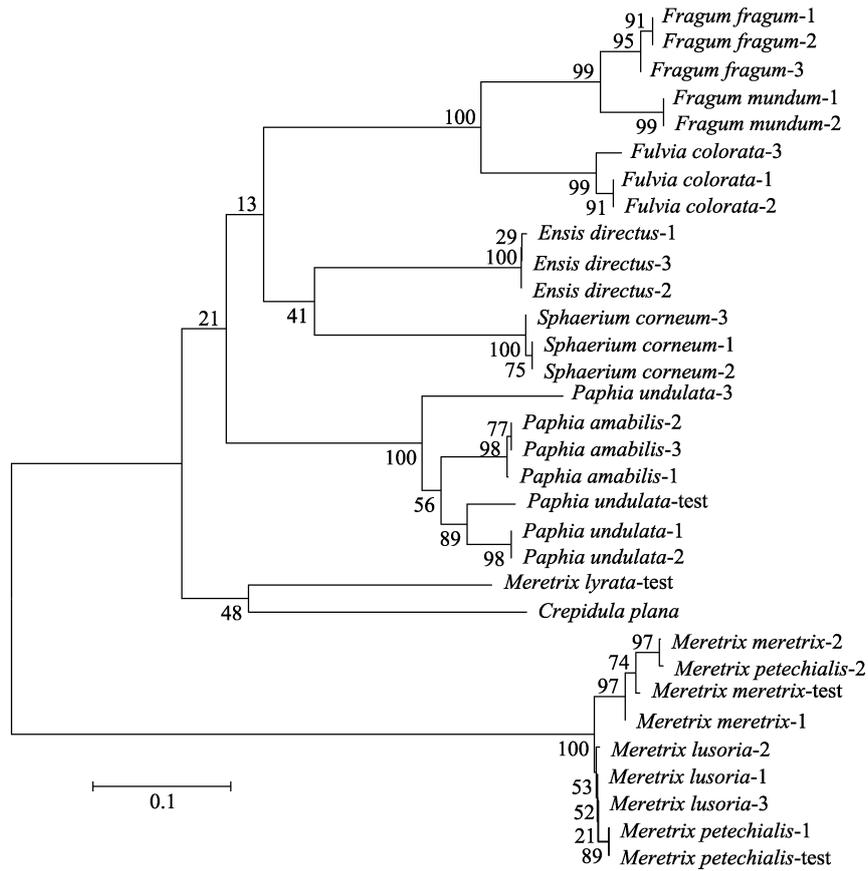


图 2 帘蛤目基于 16S rRNA 基因序列的 NJ 分子系统树

Fig. 2 NJ tree resulting from analysis of 16S rRNA gene data of species in Veneroida

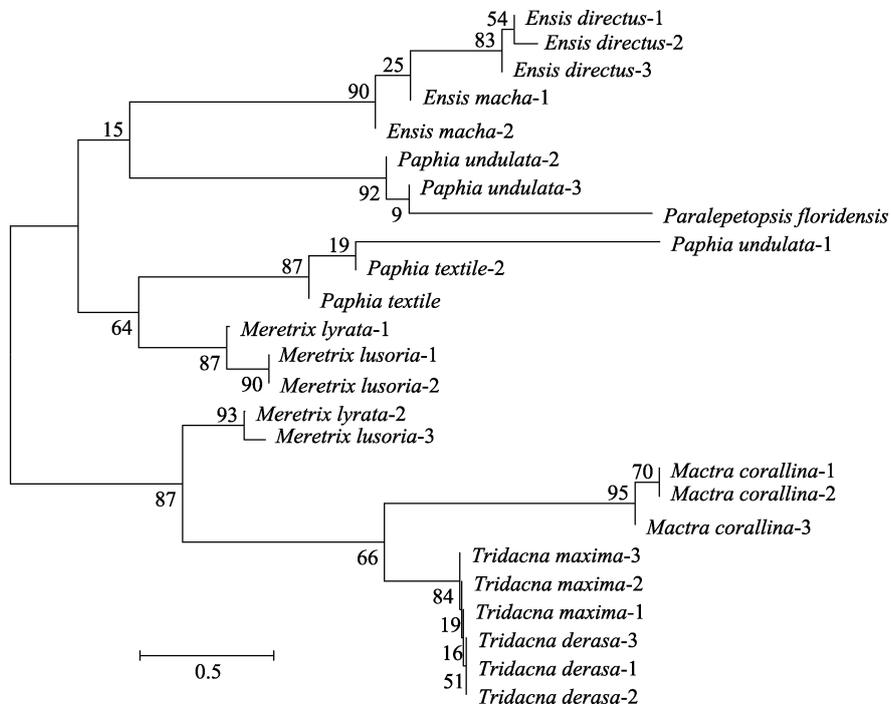


图 3 帘蛤目基于 18S rRNA 基因序列的 NJ 分子系统树

Fig. 3 NJ tree resulting from analysis of 18S rRNA gene data of species in Veneroida

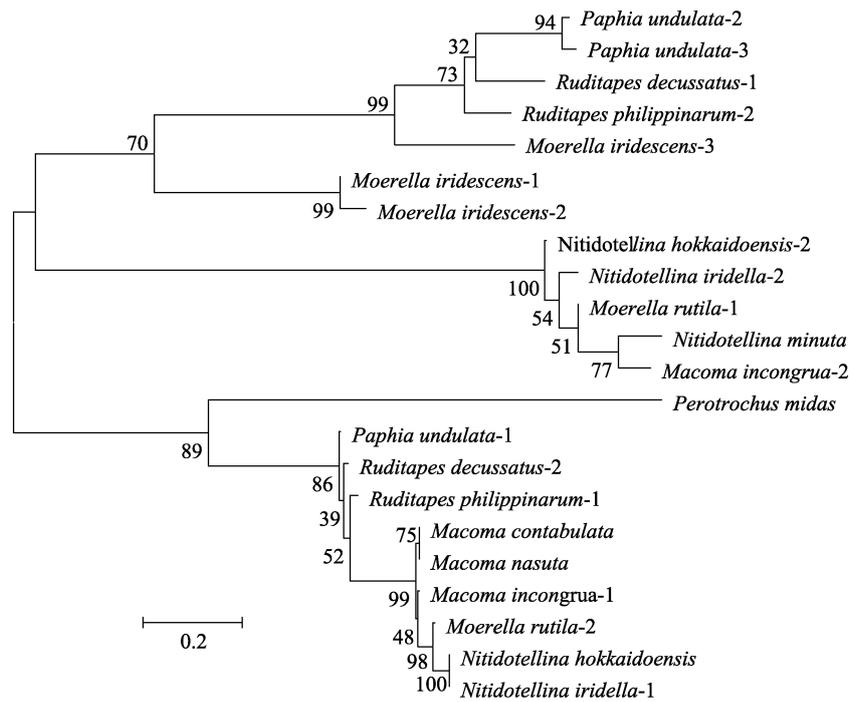


图 4 帘蛤目 28S rRNA 基因序列的 NJ 分子系统树

Fig. 4 NJ tree resulting from analysis of 28S rRNA gene data of species in Veneroida

其间隔越大、无重叠，可行性越高。学者认为很少种内差异超过 2%，而多数小于 1%<sup>[17, 23]</sup>。Hebert 等<sup>[16]</sup>提出一个 10 倍法则作为评价标准，即种间遗传距离要大于种内遗传距离，且达到 10 倍的阈值。根据此规则以及 2% 标准，本研究中，57.1% 物种的 COI 和 60.9% 物种的 16S rRNA 符合条件，而 18S rRNA 和 28S rRNA 则少有物种满足，18S rRNA 仅有 11.1% 的比例，而 14 个物种的 28S rRNA 全部不满足此标准。于贞贞<sup>[22]</sup>以 COI 基因序列利用距离法评估了异齿亚纲近缘种遗传距离，以 3% 为阈值标准，无法鉴定 42.58% 的物种，10 倍法则无法鉴定 55.59% 的物种，验证的有效性与本研究中的 COI 基本一致。不过本研究是以两个标准同时使用，比例应该比使用一个标准时低，这提高了本研究的筛选条件。本研究中，五个物种的 COI 基因序列为 1 条，无法计算种内遗传距离，计算有效性时将其排除，在一定程度上也可能影响 57.1% 这一数据。由于受到样品来源背景不清，样品量少等原因还可能导致一些数据过高或者过低估计，利用传统距离法分析鉴定物种需要建立足够多群体的数据库，才能建立有效的标准阈值。

结合 NJ 树的聚类结果，以 COI 序列所构建的进化树，87.9% 的个体能够与同种类聚成单系；以 16S rRNA 基因序列构建的进化树，能够聚成单系的个体占 65.6%，虽然一些个体未能与同种聚成单系，但是基本都能形成姐妹系，未与其他物种聚类，表现出较近的亲缘关系。利用 COI 序列所构建的进化树表现出的系统进化关系优于 16S rRNA，与传统形态分类更为相近。相对而言，18S rRNA 和 28S rRNA 在分类有效性方面较差，从距离法方面讲，少有符合 10 倍法则的种类，而且进化树显示的进化关系与形态分类相差较远。总体而言，在研究帘蛤目物种分类鉴定和系统进化方面，COI 基因相比相对保守的 16S rRNA 基因表现出一定的优势，更适合于 DNA 条形码标记，而 18S rRNA 和 28S rRNA 基因则基本不推荐使用。冯艳徽<sup>[12]</sup>研究了珍珠贝亚目和蚌目 DNA 条形码，也发现 COI 和 16S rRNA 基因能够有效鉴定扇贝科物种，而且认为 COI 基因更适合作为珍珠贝亚目的标准基因。

传统距离法和单系法的计算依据是将个体间的序列差异转化为单一距离向量来揭示物种进化，

单靠这一指标判定也具有一定的局限性。由于利用分子数据展现的系统发生关系常出现与传统分类系统不一致的现象等原因, 分子系统学常受到质疑, 但同时也有传统分类系统所无法比拟的优势, 结合两者优势, 互补其短, 将更有助于物种鉴定和系统进化研究。

#### 参考文献:

- [1] Zhang S P. Atlas of Marine Mollusk in China[M]. Beijing: China Ocean Press, 2008. [张素萍. 中国海洋贝类图鉴[M]. 北京: 海洋出版社, 2008.]
- [2] Li Q, Zou S M, Zheng X D, et al. DNA barcoding and its application in marine organisms[J]. Periodical of Ocean University of China, 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.]
- [3] Liu J. DNA taxonomy in marine bivalves: DNA barcoding in Mytilidae and Ostreidae, and cryptic diversity in the pen shell *Atrina pectinata*[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2012. [刘君. 双壳贝类 DNA 分类: 贻贝科和牡蛎科 DNA 条形码及栉江珧隐存种研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2012.]
- [4] Chen J X, Chang Y Q. Practical Manual of Double Shell Shellfish Seedling[M]. Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2006. [陈家鑫, 常亚青. 双壳贝类育苗实用手册(译)[M]. 联合国粮食及农业组织, 2006.]
- [5] Ebach M C, Holdrege C. DNA barcoding is no substitute for taxonomy[J]. Nature, 2005, 434(7034): 697.
- [6] Marshall E. Will DNA bar codes breathe life into classification?[J]. Science, 2005, 307(5712): 1037.
- [7] Kim D W, Yoo W G, Park H C, et al. DNA barcoding of fish, insects, and shellfish in Korea[J]. Genomics & Informatics, 2012, 10(3): 206-211.
- [8] Zhang J, Hanner R. Molecular approach to the identification of fish in the South China Sea[J]. PLoS ONE, 2012, 7(2): e30621.
- [9] Kundu S, Laskar B A, Venkataraman K, et al. DNA barcoding of *Nilssonia congens* corroborates existence of wild *N. nigricans* in northeast India[J]. Mitochondrial DNA, 2016, 27(4): 2753-2756.
- [10] Zhao T, Wu Q, Pan B P. Molecular phylogeny of Veneridae (Mollusca, Bivalvia) based on 16S rRNA sequences[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2013, 44(6): 1500-1505. [赵婷, 吴琪, 潘宝平. 我国重要帘蛤科(Veneridae)贝类的 16S rRNA 序列系统学分析[J]. 海洋与湖沼, 2013, 44(6): 1500-1505.]
- [11] Cui C J, Zhang L N, Wang N, et al. Progress of DNA barcoding in Algae[J]. China Biotechnology, 2012, 32(9): 113-117. [崔翠菊, 张立楠, 王娜, 等. 藻类 DNA 条形码研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2012, 32(9): 113-117.]
- [12] Feng Y W. DNA barcoding and molecular phylogeny of the Pteriina and Arcoida[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2011. [冯艳微. 珍珠贝亚目和蚌目 DNA 条形码与系统发生学研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2012.]
- [13] Moniz M B, Kaczmarek I. Barcoding diatoms: Is there a good marker?[J]. Molecular Ecology Resources, 2009, 9(s1): 65-74.
- [14] Mao Y T, Gan X N, Wang X Z. DNA barcodes and molecular phylogeny of Botiinae fishes based on the mitochondrial CO I gene[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2014, 38(4): 737-744. [毛云涛, 甘小妮, 王绪祯. 基于线粒体 CO I 基因的沙鳅亚科鱼类 DNA 条形码及其分子系统发育研究[J]. 水生生物学报, 2014, 38(4): 737-744.]
- [15] Wu B, Yang A G, Dong Y H, et al. MSAP analysis on genome-wide DNA methylation in selected and wild Japanese scallop *Patinopecten yessoensis*[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2015, 46(4): 976-982. [吴彪, 杨爱国, 董迎辉, 等. 虾夷扇贝选育群体与野生群体基因组 DNA 甲基化的 MSAP 分析[J]. 海洋与湖沼, 2015, 46(4): 976-982.]
- [16] 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.
- [17] Hebert P D, Cywinska A, Ball S L, et al. Biological identifications through DNA barcodes[J]. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 2003, 270(1512): 313-321.
- [18] Feng J B, Sun Y N, Cheng X, et al. Sequence analysis of mitochondrial COI gene of *Macrobrachium pponense* from the five largest freshwater lakes in China[J]. Journal of Fisheries of China, 2008, 32(4): 517-525. [冯建彬, 孙悦娜, 程熙, 等. 我国五大淡水湖日本沼虾线粒体 COI 基因部分片段序列比较[J]. 水产学报, 2008, 32(4): 517-525.]
- [19] 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.
- [20] Yang G, Yu J H, Xu P, et al. Phylogenetic relationship among 8 common species of catfish based on ribosome 18S and ITS sequences[J]. Chinese Journal of Zoology, 2010, 45(4): 110-117. [杨光, 俞菊华, 徐跑, 等. 利用 18S 和 ITS 序列揭示 8 种鲇形目鱼类的系统发育[J]. 动物学杂志, 2010, 45(4): 110-117.]
- [21] Luo J, Liu G Y, Tian Z C, et al. Taxonomic status of equine piroplasmid assays based on 18S rRNA gene sequencing in China[J]. Zoological Systematics, 2011, 36(1): 99-103. [罗金, 刘光远, 田占成, 等. 基于 18S rRNA 基因序列的我国马梨形虫分类学地位分析[J]. 动物分类学报, 2011, 6(1): 99-103.]
- [22] Yu Z Z. DNA barcoding and molecular phylogeny of Heterodonta[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2014. [于贞贞. 异齿亚纲贝类 DNA 条形码与系统发生学研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2014.]
- [23] Avise J C. Phylogeography: The History and Formation of Species[M]. Cambridge: Harvard University Press, 2000.

## Comparative analysis of different DNA barcoding methods for Veneroida classification and identification

WU Biao<sup>1,2</sup>, ZHAO Qing<sup>1,3</sup>, LIU Hanmiao<sup>1,3</sup>, LIU Zhihong<sup>1,2</sup>, SUN Xiujun<sup>1,2</sup>, SUN Chao<sup>4</sup>, ZHOU Liqing<sup>1,2</sup>, YANG Aiguo<sup>1,2</sup>

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;
4. Yantai Fisheries Research Institute, Yantai 264000, China

**Abstract:** DNA barcoding has been widely used in the fields of taxonomy, identification, phylogenetic evolution, and population genetic analysis of marine shellfish. To further evaluate the identification validity of different DNA barcoding genes in marine shellfish, sequences of COI, 16S rRNA, 18S rRNA, and 28S rRNA from Veneroida were randomly downloaded from the GenBank database, analyzed by the distance- and tree-based methods, and taxonomic relation established by the tree-based method, and compared the results with some sequences from our laboratory. According to the “10 × rule” and “2%” standard criterion, 57.1% of species could be distinguished using the COI gene, whereas 16S rRNA identified 60.9%, 18S rRNA identified 16.7%, and 28S rRNA did not identify any species. We also found that there were significant barcode gaps between the genetic distances of pairwise- and within-species in most genera based on COI and 16S rRNA genes; however, there were significant overlaps, instead of barcode gaps, based on 18S rRNA and 28S rRNA. The cluster analysis showed that 87.9% of individuals clustered to a monophyletic group, with other within-species individuals clustered on the COI; and 65.6% 16S rRNA individuals clustered in monophyletic groups. Furthermore individuals without monophyletic groups clustered into sister groups, which revealed that the evolutionary relationships showed by the NJ tree constructed via COI and 16S rRNA mainly agreed with that from the morphological classification, especially that of the COI gene. In contrast, the NJ tree constructed via 18S rRNA and 28S rRNA genes showed disordered clustering relationships, including some individuals from different species cluster to monophyletic groups. In the present study, the results clearly suggested that both COI and 16S rRNA can be used as DNA barcodes in identifying species in Veneroida, particular COI, but 18S rRNA and 28S rRNA are not suitable because of the large intraspecific variation. This study provides new data for DNA barcode selection in Veneroida.

**Key words:** DNA barcode; Veneroida; comparative analysis; validity

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