

中国沿海常见 螺科贝类的 DNA 条形码*

张晓洁 孔令锋 李 琪

(中国海洋大学海水养殖教育部重点实验室 青岛 266003)

DNA 条形码不仅为物种鉴定提供了有效方法,而且也有助于分类学和生物多样性研究。本
文各 COI 和 16S rRNA 基因序列应用于中国沿海 螺科贝类物种鉴定的可行性,获得了
贝类 61 个个体的 COI 和 16S rRNA 基因序列。基于 COI 基因序列的种内遗传距离为
平均为 0.67%; 属内种间遗传距离为 4.62%—19.25%, 平均为 13.02%; 基于 16S rRNA
的遗传距离为 0.00%—0.48%, 平均为 0.23%; 属内种间遗传距离为 2.47%—8.48%, 平
种基因序列在所研究的 螺中, 种内遗传差异均小于种间遗传差异, 存在明显的条形
种在系统发生树上都表现为独立的单系群。结果表明, 线粒体 COI 和 16S rRNA 基因
DNA 条形码标准基因对 螺科贝类进行有效地物种鉴定。

; COI 基因; 16S rRNA 基因; DNA 条形码; 物种鉴定

Q959.212

doi: 10.11693/hyhz20171200320

隶属于软体动物门(Mollusca)、
螺亚纲(Neritimorpha)、珍珠
螺科(Bouchet *et al.*, 2005)。该科
是软体动物, 生境多样(Tan *et al.*,
2008), 少
在海岸潮间带(Frey, 2008), 少
在潮间带(Thompson, 1980; Beesley
2008)中极少数能够生活在海洋及河
流中(Shen *et al.*, 2014)。目前世界上共记录
有 100 余种(Spencer *et al.*, 2007)。中
国, 主要分布于东南部海域(张
晓洁 *et al.*, 2017)。
螺亚纲在海洋腹足类的形态
学上具有独特的分支(Kano *et al.*, 2002),
一直备受关注。长期以来,
螺亚纲的生态学特征(Woods *et al.*, 1986;
Shen *et al.*, 2008; Jagt *et al.*, 2008), 而大
规模的辐射进化出多样的贝壳形
态, 使得贝壳形态特征为依据容易
造成误判(Grüneberg, 1976, 1982,

Dekker, 2000; 陈志云等, 2016), 例如分类以及生态
研究中常常将漆黑 螺 *N. atramentosa* Reeve, 1855 和
小黑 螺 *N. melanotragus* E. A. Smith, 1884 这两个种
混淆(Underwood, 1976, 2004; Waters *et al.*, 2005)。

与传统分类学方法相比, DNA 条形码在物种的
快速鉴定、发现新种和隐存种等方面有着显著优势。
自 2003 年 Hebert 提出 DNA 条形码概念(Hebert *et al.*,
2003), 越来越多的生物学家应用这种方法进行物种
鉴定和系统发生研究。由于能够从生物体的部分零散
组织中对物种进行快速鉴定, DNA 条形码技术已经
开始应用于食品鉴定与保护生物学领域(Galimberti *et al.*,
2013; Sheth *et al.*, 2017); DNA 条形码也能够生物
的不同生长阶段鉴定物种, 而且这种能力已经在
多种动物类群中得到证实(Azmir *et al.*, 2017;
Hofmann *et al.*, 2017); 此外, DNA 条形码技术在分子
系统发育和群体遗传学方面的应用也正被广泛关注
(Padula *et al.*, 2017)。

在 螺的分类学研究中, 应用 DNA 条形码技术
可以在很大程度上避免贝壳形态多样性带来的误导。

基金项目: 31772414 号; 中央高校基本科研业务费, 201762014 号。张晓洁, 硕士研究生, E-mail:

通讯作者: 孔令锋, 教授, E-mail: lhf@ouc.edu.cn

收稿日期: 2017-12-20, 收修改

Chee





图 1 中国海洋生物学报中的物种
Fig. 1 Species in *Neritidae* in this study

78; 1. 螺 *Nerita yoldii* (Lucas, 1841); C. 日本 螺 *Nerita japonica* De
1. 游 螺 *Voluta chinensis* (C. Lin., 1751); E. 奥 螺 *Clid*

35 年 行 计 算 机 仿 真 (H)、平均核并

括 酒 多 生 用 M

2013 年 分 析 组 成 离, 应用

接 距 离 法 (N

Kimura.

行 次 自 然

软件包)外 化 成 个 体 的 C

误, 最 的 拼

通

(Bootstrap) N

螺 (*Trochus*

Tab.4 Kimura-2-parameter genetic average distances based on 16SrRNA gene fragments of Neritidae species (%)

物种	4	16rSRNA	Kimura-2-parameter (%)							
			1	2	3	4	5	6	7	
渔舟 螺		<i>N. albicilla</i>	0.42							
齿纹 螺		<i>N. yoldii</i>	8.48	0.13						
日本 螺		<i>N. japonica</i>	8.08	2.47	0.00					
黑玉 螺		<i>N. incerta</i>	7.78	7.44	7.59	-				
紫游螺		<i>N. violaceum</i>	15.40	17.02	17.28	16.29	0.07			
奥莱彩螺		<i>C. oualaniense</i>	15.25	15.73	16.59	16.09	6.17	0.48		
多色彩螺		<i>C. sowerbianum</i>	15.62	17.86	18.12	17.11	4.11	4.55	0.28	

2.2 条形码间隙

条形码间隙的研究主要依赖于种内遗传差异和种间遗传差异的比较,理想的条形码标准基因应该在种内、种间遗传距离水平上存在明显的条形码间隙(barcoding gap),并可有效区分物种。由表 3 可知,基于 COI 基因序列的种内个体间遗传距离为 0.00%—1.29%,平均为 0.67%,种内遗传距离最大值发生在奥莱彩螺内;属内种间遗传距离为 4.62%—19.25%,平均为 13.02%,种间最小遗传距离发生在齿纹 螺和日本 螺之间。基于 16S rRNA 基因序列的种内遗传距离为 0.00%—0.48%,平均为 0.23%,种内遗传距离最大值发生在奥莱彩螺内;属内种间遗传距离为 2.47%—8.48%,平均为 6.37%,种

间最小遗传距离发生在齿纹 螺和日本 螺之间(表 4)。两种基因序列在所研究 螺种类中,种内遗传差异均小于种间遗传差异,均存在明显的条形码间隙(barcoding gap),但基于 COI 基因序列的 DNA 条形码间隙比基于 16S rRNA 基因序列的 DNA 条形码间隙显著。

2.3 分子系统发生树

基于 COI 和 16S rRNA 基因片段构建的邻接树(NJ 树)见图 2 和图 3。NJ 树显示两种基因片段的聚类结果具有一致性,且 7 种 螺均表现为单系群,并且具有很高的支持度。基于 COI 和 16S rRNA 基因拼接序列构建的最大似然树(ML 树)见图 4。7 种 螺同样以较高的支持度形成单系群。

螺 16S rRNA 基因片段

的 16S rRNA 基因片段，并基于该片段对螺类物种进行了鉴定。图中数值表示 Bootstrap 支持率。

个假设: 一是种内遗传即存在条形码间隙, 即生上种与种之间互为 (Hebert *et al.*, 2004a)。对使用 Hebert 等(2003)提出的方法进行区分, 即种间遗传距离为 10 倍(李琪等, 2010; 和 16S rRNA 两种基因存在明显条形码间隙, 小于属内不同物种之间的遗传距离均比种间 16S rRNA 基因序列尽管也同时能够将本研究有效区分开。另外, 通过邻接树可以看出, 7 个单系群。因此, COI 和 16S rRNA 作为螺科贝类 DNA 条形码值得提及的是, 在对 COI 基因的 Folmer 等个体进行成功扩增, 而使用 Palumbi (1996) 的通用引物在螺科物种的 COI 基因序列可能更快速。

传统的形态分类最大的缺点是缺少形态数据或因变异的种类 (Hebert *et al.*, 2004a), 且壳的贝壳形态、颜色十分相似。日本螺 *N. japonica*, 彩虹螺 *C. sowerbianum* 的分类学很可能导致鉴别困难。COI 和 16S rRNA 基因都可

用于拼接序列的最大似然法分析, 螺科物种聚为一支(支持度 100%)。Fukumori 等(2016)的研究发现, *N. yoldii* 和日本螺 *N. japonica* 属于同一系; 彩虹螺属 *Clithon* 和 *C. sowerbianum* 亚科以 100% 的支持度聚在一起。螺亚科 Neritinae 的物种多样性相对较低, 针对它们之间

基因数据(如线粒体基因组和转录组)开展进一步分析。

4 结论

研究表明 DNA 条形码能够在种水平上将螺科贝类进行区分, 这为应用 DNA 条形码来探讨我国沿海不同生境螺科的物种多样性奠定了重要基础。未来可以通过强化标本采集, 结合传统形态学分类与 DNA 条形码等手段, 进一步明确中国沿海螺科种属组成和区系特点。

参 考 文 献

- 孙超, 刘志鸿, 杨爱国等, 2014. 4 种河蓝蛤线粒体 COI 和 16S rRNA 基因序列的种间遗传分析. 渔业科学进展, 35(1): 82—90
- 李琪, 邹山梅, 郑小东等, 2010. DNA 条形码及其在海洋生物中的应用. 中国海洋大学学报(自然科学版), 40(8): 43—47
- 张素萍, 2008. 中国海洋贝类图鉴. 北京: 海洋出版社, 46
- 陈军, 李琪, 孔令锋等, 2010. 基于 COI 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. 动物学研究, 31(4): 345—352
- 陈志云, 连喜平, 谭焯辉等, 2016. 螺科软体动物系统分类学研究进展. 海洋科学, 40(8): 168—173
- Azmir I A, Esa Y, Amin S M N *et al.*, 2017. Identification of larval fish in mangrove areas of Peninsular Malaysia using morphology and DNA barcoding methods. *Journal of Applied Ichthyology*, 33(5): 998—1006
- Beesley P L, Ross G J B, Wells A, 1998. *Mollusca: The Southern Synthesis*. Melbourne: CSIRO Publishing, 693—702
- Bouchet P, Rocroi J P, 2005. Classification and nomenclator of gastropod families. *Malacologia*, 47(1—2): 1—397
- Chee S Y, 2015. Limitations of cytochrome oxidase I for the barcoding of Neritidae (Mollusca: Gastropoda) as revealed by Bayesian analysis. *Genetics & Molecular Research*, 14(2): 5677—5684
- Chee S Y, Mohd Nor S A, 2016. DNA barcoding reveals neritid diversity (Mollusca: Gastropoda) diversity in Malaysian waters. *Mitochondrial DNA Part A: DNA Mapping, Sequencing, and Analysis*, 27(3): 2282—2284
- Dekker H, 2000. The Neritidae (Gastropoda) from the circumarabian seas, with the description of two new species, a new subgenus and a new genus. *Vita Marina*, 47(2): 29—64
- Folmer O, Black M, Hoeh W *et al.*, 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3(5): 294—299
- Frey M A, 2008. A revised classification of the gastropod genus *Nerita*. *The Veliger*, 51(1): 1—7
- Fukumori H, Kano Y, 2014. Evolutionary ecology of settlement size in planktotrophic neritimorph gastropods. *Marine*

- genome of the stream snail *Clithon retropictus* (Neritimorpha: Neritidae). Mitochondrial DNA Part B: Resources, 1(1): 820—821
- Galimberti A, De Mattia F, Losa A *et al*, 2013. DNA barcoding as a new tool for food traceability. Food Research International, 50(1): 55—63
- Grüneberg H, 1976. Population studies on a polymorphic prosobranch snail (*Clithon(Pictoneritina) oualaniensis* Lesson). Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 275(940): 385—437
- Grüneberg H, 1982. Pseudo-polymorphism in *Clithon oualaniensis*. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 216(1203): 147—157
- Hall T A, 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series, 41: 95—98
- Hebert P D N, Cywinska A, Ball S L *et al*, 2003. Biological identifications through DNA barcodes. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 270(1512): 313—321
- Hebert P D N, Stoeckle M Y, Zemlak T S *et al*, 2004a. Identification of birds through DNA barcodes. PLoS Biology, 2(10): e312
- Hebert P D N, Penton E H, Burns J M *et al*, 2004b. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 101(41): 14812—14817
- Hofmann T, Knebelsberger T, Kloppmann M *et al*, 2017. Egg identification of three economical important fish species using DNA barcoding in comparison to a morphological determination. Journal of Applied Ichthyology, 33(5): 925—932
- Jagt J W M, Kiel S, 2008. The operculum of *Otostoma retzii* (Nilsson, 1827) (Gastropoda, Neritidae; Late Cretaceous) and its phylogenetic significance. Journal of Paleontology, 82(1): 201—205
- Kano Y, Chiba S, Kase T, 2002. Major adaptive radiation in neritopsine gastropods estimated from 28S rRNA sequences and fossil records. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 269(1508): 2457—2465
- Kimura M, 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. Journal of Molecular Evolution, 16(2): 111—120
- Librado P, Rozas J, 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. Bioinformatics, 25(11): 1451—1452
- Nguyen L T, Schmidt H A, Von Haeseler A *et al*, 2015. IQ-TREE:

DNA BARCODING IN NERITIDAE (NERITIMORPHA) ALONG THE COAST OF CHINA

ZHANG Xiao-Jie, KANG

(The Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Zhejiang University of Oceanography, Zhoushan, Zhejiang, China)

Abstract DNA barcoding is not only providing an efficient method for species identification, but also providing an efficient taxonomy and biodiversity. This study is aimed at assessing the genetic diversity of Neritidae along the coast of China. We sequenced partial sequences of COI and 16S rRNA genes of 7 species of 3 genera. Our analysis showed that K1P-distances based on COI between conspecific individuals were from 0.00% to 1.29% (0.67% on average), distances between conspecific individuals based on 16S rRNA were from 0.00% to 1.29% (0.67% on average); K2P-distances based on 16S rRNA between conspecific individuals were from 0.00% to 1.29% (0.67% on average); distances between congeneric sequences were from 2.47% to 8.44% (5.45% on average). These results supported the phylogenetic trees. These evidenced that the Neritidae species can be identified by the 16S rRNA gene sequences.

Key words Neritidae; COI gene; 16S rRNA gene; DNA barcoding