

中国沿海常见蛻螺科贝类的 DNA 条形码*

张晓洁 孔令锋^① 李琪

(中国海洋大学海水养殖教育部重点实验室 青岛 266003)

摘要 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。本研究旨在探讨将 COI 和 16S rRNA 基因序列应用于中国沿海蛻螺科贝类物种鉴定的可行性,获得了该科 3 属 7 种贝类 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 0.00—1.29%,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 基因序列的种内遗传距离为 0.00%—0.48%,平均为 0.23%;属内种间遗传距离为 2.47%—8.48%,平均为 6.37%。两种基因序列在所研究的蛻螺中,种内遗传差异均小于种间遗传差异,存在明显的条形码间隙,所有物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 基因序列可以作为 DNA 条形码标准基因对蛻螺科贝类进行有效地物种鉴定。

关键词 蛻螺; COI 基因; 16S rRNA 基因; DNA 条形码; 物种鉴定

中图分类号 Q959.212 **doi:** 10.11693/hyhz20171200320

蛻螺科(Neritidae)隶属于软体动物门(Mollusca)、腹足纲(Gastropoda)、蛻螺亚纲(Neritimorpha)、珍珠蛻螺目(Cycloneritimorpha)(Bouchet *et al.*, 2005)。该科贝类是一类广盐性腹足类动物,生境多样(Tan *et al.*, 2008),绝大多数生活在海岸潮间带(Frey, 2008),少数生活在淡水和河口地带(Thompson, 1980; Beesley *et al.*, 1998),为贝类当中极少数能够生活在海洋及河川的种类(Fukumori *et al.*, 2014)。目前世界上共记录蛻螺科 16 属,现生种 280 余种(Spencer *et al.*, 2007)。中国已发现蛻螺 40 种左右,主要分布于东南部海域(张素萍, 2008)。

蛻螺科以及整个蛻螺亚纲在海洋腹足类的形态结构和系统演化上是较独特的分支(Kano *et al.*, 2002),在软体动物分类学研究中一直备受关注。长期以来,蛻螺科的分类主要基于形态学特征(Woods *et al.*, 1986; Schütt *et al.*, 1992; Frey, 2008; Jagt *et al.*, 2008),而大多数蛻螺科种类由于适应辐射进化出多样的贝壳形态以及生态习性,仅依靠贝壳形态特征为依据容易产生鉴定错误和分类争议(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蛻螺 *N. atramentosa* Reeve, 1855 和小黑蛻螺 *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 条形码也能够在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)。

在蛻螺的分类学研究中,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。

* 国家自然科学基金资助项目, 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: 2275048929@qq.com

通讯作者: 孔令锋, 教授, E-mail: klfaly@ouc.edu.cn

收稿日期: 2017-12-20, 收修改稿日期: 2018-01-15

Chee 等(2016)、Chee(2015)利用 DNA 条形码技术研究了马来西亚蛭螺科 *Nerina* 属与 *Neritina* 属的物种多样性, 发现了 3 个新纪录种。本研究以中国东南沿海 3 属 7 种蛭螺为材料, 分析了 COI 和 16S rRNA 基因的遗传变异, 旨在探讨 DNA 条形码技术在蛭螺科贝类鉴定中的可行性。

1 材料与方法

1.1 样品采集

本研究所用 61 个蛭螺科样品均采自中国东南沿海, 固定于 95% 酒精溶液中, 保存于中国海洋大学水产学院贝类遗传育种研究室。依据 Okutani(2017)、

WoRMS (世界海洋物种名录, World Register of Marine Species, <http://www.marinespecies.org/index.php>) 等文献资料进行鉴定, 这些样品隶属于 3 属 7 种, 分别为渔舟蛭螺 *Nerita albicilla* Linnaeus, 1758、齿纹蛭螺 *Nerita yoldii* Récluz, 1841、日本蛭螺 *Nerita japonica* Dunker, 1860、黑玉蛭螺 *Nerita incerta* von dem Busch, 1844、紫游螺 *Neripteron violaceum* (Gmelin, 1791)、奥莱彩螺 *Clithon oualaniense* (Lesson, 1831) 和多色彩螺 *Clithon sowerbianum* (Récluz, 1843)。研究所用样品的采集时间、采集地点、单倍型和 Genbank 序列号等详细信息见表 1, 代表个体如图 1 所示。

表 1 样品信息
Tab.1 The specifications of samples

物种	样品编号	采集时间	采集地点	COI 单倍型编号	GenBank 序列号	16SrRNA 单倍型编号	GenBank 序列号
	YZDL1	20080510	海南文昌	Hap1	MF687991	Hap1	MF687964
	YZDL2	20080510	海南文昌	Hap2	MF687992	Hap2	MF687965
	YZDL3	20130917	广东阳江	Hap2	MF687992	Hap3	MF687966
	YZDL4	20080409	广西涠洲岛	Hap2	MF687992	Hap3	MF687966
	YZDL5	20080409	广西涠洲岛	Hap3	MF687993	Hap3	MF687966
	YZDL6	20080218	海南三亚	Hap4	MF687994	Hap3	MF687966
	YZDL7	20080218	海南三亚	Hap5	MF687995	Hap3	MF687966
	YZDL8	20080510	海南文昌	Hap5	MF687995	Hap3	MF687966
	YZDL9	20080426	广西防城港	Hap6	MF687996	Hap3	MF687966
	YZDL10	20080415	广西北海	Hap7	MF687997	Hap3	MF687966
	YZDL11	20080403	广西北海	Hap8	MF687998	Hap3	MF687966
	YZDL12	20130917	广东阳江	Hap9	MF687999	Hap3	MF687966
	YZDL13	20080512	海南临高	Hap10	MF688000	Hap4	MF687967
渔舟蛭螺 <i>Nerita albicilla</i>	YZDL14	20080426	广西防城港	Hap11	MF688001	Hap4	MF687967
	YZDL15	20080409	广西涠洲岛	Hap12	MF688002	Hap4	MF687967
	YZDL16	20080409	广西涠洲岛	Hap13	MF688003	Hap4	MF687967
	YZDL17	20080419	广东湛江	Hap13	MF688003	Hap4	MF687967
	YZDL18	20080403	广西北海	Hap13	MF688003	Hap4	MF687967
	YZDL19	20080403	广西北海	Hap13	MF688003	Hap4	MF687967
	YZDL20	20080403	广西北海	Hap13	MF688003	Hap5	MF687968
	YZDL21	20080510	海南文昌	Hap13	MF688003	Hap6	MF687969
	YZDL22	20080419	广东湛江	Hap13	MF688003	Hap7	MF687970
	YZDL23	20130915	福建漳州东山	Hap14	MF688004	Hap8	MF687971
	YZDL24	20130915	福建漳州东山	Hap15	MF688005	Hap9	MF687972
	YZDL25	20080218	海南三亚	Hap16	MF688006	Hap10	MF687973
	YZDL26	20080403	广西北海	Hap17	MF688007	Hap11	MF687974
	YZDL27	20080409	广西涠洲岛	Hap18	MF688008	Hap12	MF687975

续表

物种	样品编号	采集时间	采集地点	COI 单倍型编号	GenBank 序列号	16SrRNA 单倍型编号	GenBank 序列号
齿纹蜃螺 <i>Nerita yoldii</i>	CWDL1	20090824	福建福清	Hap19	MF688011	Hap13	MF687978
	CWDL2	20080426	广西防城港	Hap20	MF688012	Hap13	MF687978
	CWDL3	20080414	广西北海	Hap21	MF688013	Hap13	MF687978
	CWDL4	20070629	浙江嵊泗	Hap22	MF688014	Hap13	MF687978
	CWDL5	20070627	浙江舟山	Hap22	MF688014	Hap13	MF687978
	CWDL6	20130917	广东阳江	Hap22	MF688014	Hap13	MF687978
	CWDL7	20070627	浙江舟山	Hap22	MF688014	Hap14	MF687979
	CWDL8	20130917	广东阳江	Hap23	MF688015	Hap14	MF687979
	CWDL9	20070615	浙江南麂	Hap24	MF688016	Hap15	MF687980
日本蜃螺 <i>Nerita japonica</i>	RBDL1	20100603	浙江南麂	Hap25	MF688010	Hap16	MF687977
	RBDL2	20070615	浙江南麂	Hap25	MF688010	Hap16	MF687977
	RBDL3	20070615	浙江南麂	Hap25	MF688010	Hap16	MF687977
	RBDL4	20070615	浙江南麂	Hap25	MF688010	Hap16	MF687977
	RBDL5	20070615	浙江南麂	Hap25	MF688010	Hap16	MF687977
黑玉蜃螺 <i>Nerita incerta</i>	HYDL1	20080510	海南文昌	Hap26	MF688009	Hap17	MF687976
紫游螺 <i>Neripteron violaceum</i>	ZYL1	20170422	广西防城港	Hap27	MF688017	Hap18	MF687981
	ZYL2	20170422	广西防城港	Hap28	MF688018	Hap18	MF687981
	ZYL3	20170422	广西防城港	Hap28	MF688018	Hap18	MF687981
	ZYL4	20170422	广西防城港	Hap29	MF688019	Hap18	MF687981
	ZYL5	20170422	广西防城港	Hap30	MF688020	Hap18	MF687981
	ZYL6	20170422	广西防城港	Hap30	MF688020	Hap19	MF687982
奥莱彩螺 <i>Clithon oualaniense</i>	ALCL1	20080401	广西北海	Hap31	MF687983	Hap20	MF687956
	ALCL2	20080401	广西北海	Hap31	MF687983	Hap21	MF687957
	ALCL3	20170418	广西北海	Hap31	MF687983	Hap21	MF687957
	ALCL4	20170418	广西北海	Hap31	MF687983	Hap21	MF687957
	ALCL5	20080401	广西北海	Hap32	MF687984	Hap21	MF687957
	ALCL6	20170418	广西北海	Hap33	MF687985	Hap21	MF687957
	ALCL7	20170418	广西北海	Hap34	MF687986	Hap21	MF687957
	ALCL8	20080401	广西北海	Hap35	MF687987	Hap22	MF687958
	ALCL9	20080401	广西北海	Hap35	MF687987	Hap23	MF687959
	ALCL10	20080401	广西北海	Hap36	MF687988	Hap24	MF687960
多色彩螺 <i>Clithon sowerbianum</i>	DSCL1	20170418	广西北海	Hap37	MF687989	Hap25	MF687961
	DSCL2	20170418	广西北海	Hap37	MF687989	Hap26	MF687962
	DSCL3	20170418	广西北海	Hap38	MF687990	Hap27	MF687963

1.2 DNA 扩增及测序

采用 CTAB 法对样品 DNA 进行抽提(Winnepeninckx *et al.*, 1993)。目的片段分别采用无脊椎动物 COI 基因片段的通用引物序列 LCO1490/HCO2198 (Folmer *et al.*, 1994)和 16S rRNA 基因片段的通用引物序列 16Sar/16Sbr (Palumbi, 1996)进行扩增。COI 通用引物对大部分样品并不适用, 对于那些使用 COI 通用引

物无法成功扩增的样品, 本研究自行设计了特异性引物, 而所有样品的 16S rRNA 基因均能够被成功扩增, 引物信息如表 2 所示。

引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成。扩增采用 50 μ L 反应体系, 含 10 \times PCR Buffer (Mg²⁺ Plus), 2.5mmol/L dNTP, 10 μ mol/L 正反引物, 5U/ μ L Taq DNA 聚合酶(Takara), DNA 模板约 100ng。



图 1 本研究中所使用的 7 个蜑螺科物种

Fig.1 7 species of Neritidae in this study

注: A. 渔舟蜑螺 *Nerita albicilla* Linnaeus, 1758; B. 齿纹蜑螺 *Nerita yoldii* Récluz, 1841; C. 日本蜑螺 *Nerita japonica* Dunker, 1860; D. 黑玉蜑螺 *Nerita incerta* von dem Busch, 1844; E. 紫游螺 *Neripteron violaceum* (Gmelin, 1791); F. 奥莱彩螺 *Clithon oualaniense* (Lesson, 1831); G. 多色彩螺 *Clithon sowerbianum* (Récluz, 1843)

PCR 反应参数为: 94°C 预变性 3min; 35 次循环, 每次循环包括: 94°C 变性 30s, 48°C (COI)/52°C (16S rDNA) 退火 30s, 72°C 延伸 1min; 最后 72°C 延伸 10min, 4°C 保存。PCR 产物经 1.5% 的琼脂糖电泳检测后进行纯化测序。纯化与测序由华大基因科技股份有限公司完成。

1.3 数据分析

所得序列经 SeqMan 软件(DNASTAR®软件包)处理, 并结合人工校对, 确定每一位点准确无误, 最后将序列提交至 GenBank 数据库。使用 BioEdit v.7.2.6.1 (Hall, 1999)软件中内置的 Clustal W 多序列比对程序对 COI 和 16S rRNA 基因序列分别进行比对, 并去掉正反引物序列。用 DnaSp 5.0 (Librado *et al*, 2009)

软件计算样品的单倍型数(H)、平均核苷酸差异(K)及核苷酸多样性指数(π)。采用 MEGA 6.0 (Tamura *et al*, 2013)软件分析序列碱基组成, 计算遗传距离, 应用邻接距离法(NJ, Neighbor-Joining)构建系统发育树, 选用 K2P 替代模型(Kimura-2-parameter, K2P)(Kimura, 1980), 进行 1000 次自检。由于 NJ 树不能真实反映物种的进化历史, 我们使用 61 个个体的 COI 和 16S rRNA 基因的拼接序列构建了最大似然树(Maximum Likelihood, ML)。ML 树利用 IQ-TREE (Nguyen *et al*, 2015)构建, COI 和 16S rRNA 基因分区对应的模型均为 GTR+ Γ , 通过 1000 次重复分析自检支持率(Bootstrap)。NJ 树和 ML 树选取马蹄螺(*Trochus*

maculatus, COI: GenBank, AB505301.1; 16S: Genbank, AB505344.1)作为外类群。

2 结果与分析

2.1 序列特征

经 PCR 扩增、测序, COI 和 16S rRNA 基因序列分别得到 61 条, 共 122 条序列。双向测序获得的 COI 基因片段长度在 377—715bp 之间, 16S rRNA 基因片段长度在 498—555bp 之间。对剪切比对之后的同源序列进行分析, COI 基因 A、T、C、G 平均含量分别为 20.98%、40.80%、16.21%、22.02%, T 含量明显高于其他三种碱基, G+C(38.23%)平均含量明显低于 A+T(61.77%)含量。16S rRNA 基因 A、T、C、G 平均含量分别为 32.56%、29.38%、18.82%、19.25%, 其中 A 含量的总体水平最高, G+C(38.07%)平均含量同样明显低于 A+T(61.93%)含量。碱基均出现明显的偏倚性, 符合线粒体碱基组成的特点, 这与帘蛤目(陈

军等, 2010)、河蓝蛤(孙超等, 2014)等其他软体动物研究中的结果是相一致的。

获得的蛭螺科贝类序列分别定义了 38 个 COI 基因单倍型和 27 个 16S rRNA 基因单倍型(表 1), 不同种之间未出现共享单倍型。其中 COI 基因片段的平均核苷酸差异数为 39.293, 核苷酸多样性指数为 0.10736; 16S rRNA 基因片段的平均核苷酸差异数为 36.667, 核苷酸多态性指数为 0.07687。COI 基因片段的 715 个位点中, 保守位点数为 476, 约占位点总数的 66.6%; 变异位点数为 237 个, 其中简约信息位点数为 211 个; 序列间所有位点的转换/颠换比率为 2.77; 16SrRNA 基因片段的 560 个位点中, 保守位点数为 436, 约占位点总数的 77.9%; 变异位点数为 123 个, 其中简约信息位点数为 101 个; 序列间所有位点的转换/颠换比率为 2.70。COI 和 16S rRNA 基因各序列之间的差异度与遗传距离均成线性关系, 且转换大于颠换, 碱基替换未达到饱和。

表 2 本研究所用引物
Tab.2 Primers used in this study

物种	缩写	引物名称	序列(5'—3')	引物长度	引物来源
齿纹蛭螺	<i>N. yoldii</i>	LCO1490	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	25	Folmer <i>et al</i> , 1994
多色彩螺	<i>C. sowerbianum</i>	HCO2198	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	26	Folmer <i>et al</i> , 1994
紫游螺	<i>N. violaceum</i>	COIF-YZ	GCCCTAAGTCTTTTGATTTCG	20	本研究
奥莱彩螺	<i>C. oualaniense</i>	COIR-YZ	GCAAGAACAGGCAGAGAAAGT	21	
渔舟蛭螺	<i>N. albicilla</i>	COIF-RB	CTGCTTTGAGTCTTTTGATTTCG	23	本研究
日本蛭螺	<i>N. japonica</i>	COIR-RB	ATAACATTGTAATCGCACCTG	21	
黑玉蛭螺	<i>N. incerta</i>	COIF-AL	GGTTGGTAGGAAGTCTCTTAG	22	Palumbi, 1996
奥莱彩螺	<i>C. oualaniense</i>	COIR-AL	GATCATACAAATAATGGAAGACG	23	
以上所有		16Sar	CGCCTGTTTATCAAAAACAT	20	Palumbi, 1996
		16Sbr	CCGGTCTGAACTCAGATCACGT	22	

表 3 基于 COI 基因序列的蛭螺 Kimura-2-parameter 平均遗传距离(%)
Tab.3 Kimura-2-parameter genetic average distances based on COI gene fragments of Neritidae (%)

物种	1	2	3	4	5	6	7
渔舟蛭螺	<i>N. albicilla</i>	0.72					
齿纹蛭螺	<i>N. yoldii</i>	12.93	0.37				
日本蛭螺	<i>N. japonica</i>	16.71	4.62	0.00			
黑玉蛭螺	<i>N. incerta</i>	13.38	11.34	15.06	-		
紫游螺	<i>N. violaceum</i>	19.06	15.32	16.11	19.48	0.52	
奥莱彩螺	<i>C. oualaniense</i>	22.59	21.14	24.85	25.26	16.77	1.29
多色彩螺	<i>C. sowerbianum</i>	22.24	17.35	20.08	21.14	13.94	19.25

表 4 基于 16rSRNA 基因序列的蛭螺 Kimura-2-parameter 平均遗传距离(%)
Tab.4 Kimura-2-parameter genetic average distances based on 16SrRNA gene fragments of Neritidae species (%)

物种		1	2	3	4	5	6	7
渔舟蛭螺	<i>N. albicilla</i>	0.42						
齿纹蛭螺	<i>N. yoldii</i>	8.48	0.13					
日本蛭螺	<i>N. japonica</i>	8.08	2.47	0.00				
黑玉蛭螺	<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蛭螺和日本蛭螺之间。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蛭螺和日本蛭螺之间(表 4)。两种基因序列在所研究蛭螺种类中,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 种蛭螺均表现为单系群,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 种蛭螺同样以较高的支持度形成单系群。

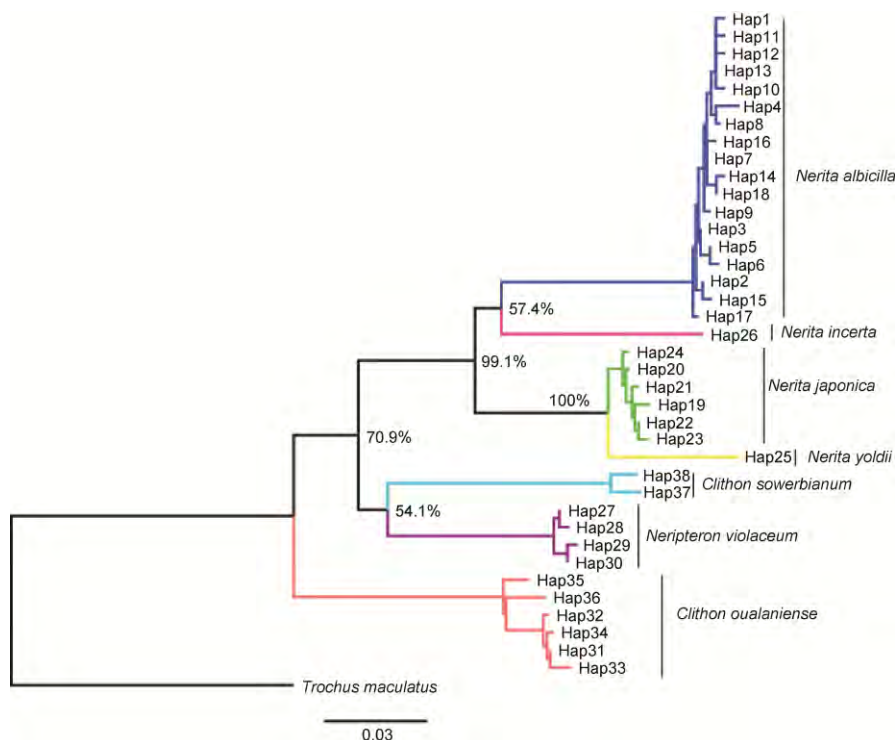


图 2 基于蛭螺 COI 基因片段的 NJ 树

Fig.2 NJ tree of Neritidae species based on the partial COI gene
注: 节点处数值表示 Bootstrap 1000 次重复抽样检测结果

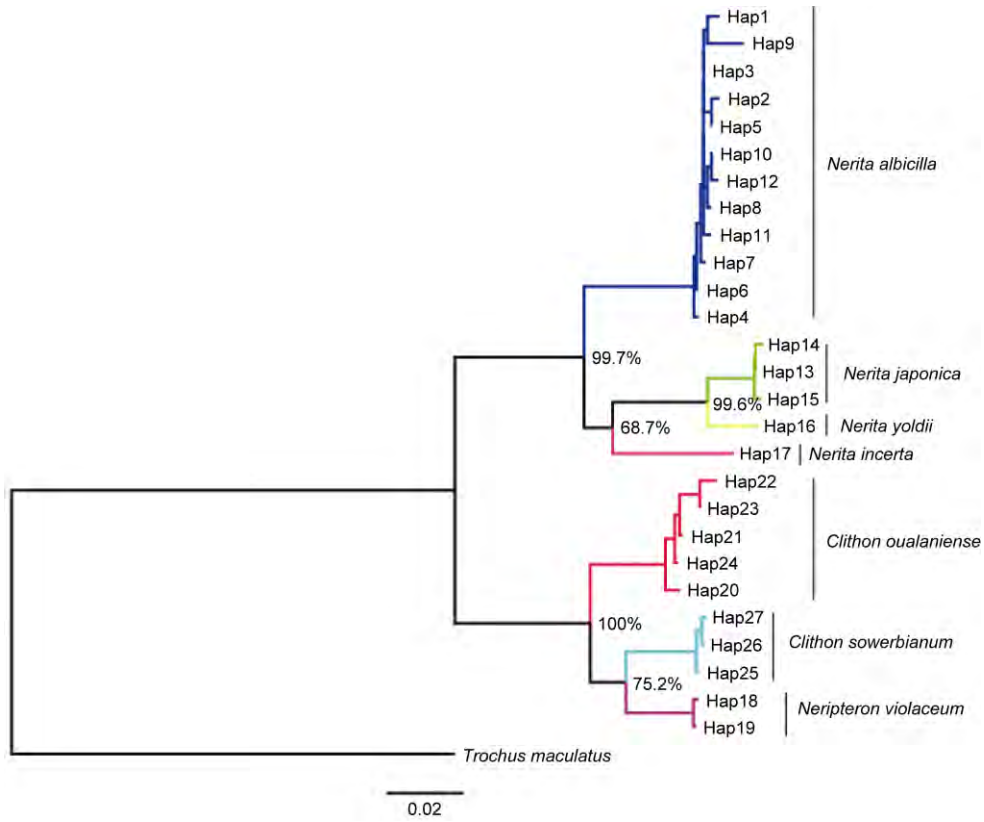


图 3 基于蛻螺 16S rRNA 基因片段的 NJ 树

Fig.3 NJ tree of Neritidae species based on the partial 16SrRNA gene
注: 节点处数值表示 Bootstrap 1000 次重复抽样检测结果

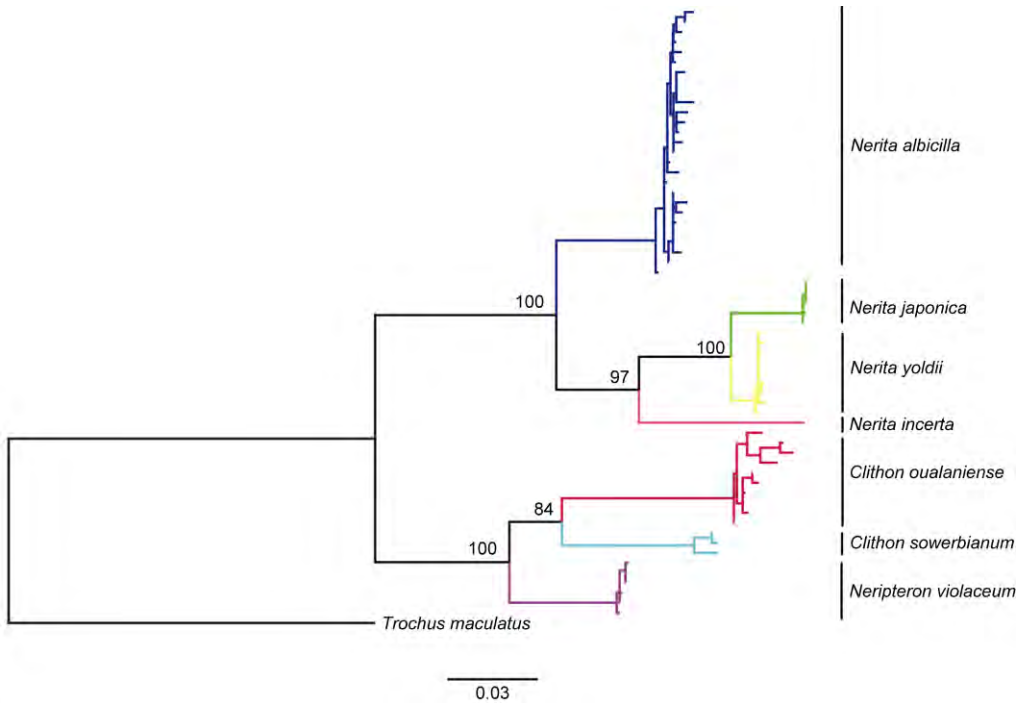


图 4 基于蛻螺 COI 和 16S rRNA 基因拼接序列的最大似然树(ML 树)

Fig.4 Maximum likelihood tree of Neritidae species based on the concatenated COI and 16S rRNA gene
注: 节点处数值为 ML 支持率

3 讨论

DNA 条形码理论基于两个假设: 一是种内遗传差异小于种间遗传差异, 即存在条形码间隙 (barcoding gap); 二是在系统发生上种与种之间互为单系群 (monophyletic group) (Hebert *et al.*, 2004a)。对于条形码间隙, 过去研究通常使用 Hebert 等 (2003) 提出的“10 倍法则”来对不同物种进行区分, 即种间遗传差异应达到种内遗传差异的 10 倍 (李琪等, 2010; 陈军等, 2010)。本研究中, COI 和 16S rRNA 两种基因序列在蛭螺科的 7 个物种中均存在明显条形码间隙, 同种个体间的遗传差异均明显小于属内不同物种之间的遗传差异, COI 基因序列种间的遗传距离均比种内遗传距离高出 10 倍以上, 16S rRNA 基因序列尽管不能完全符合“10 倍法则”, 但也同样能够将本研究涉及的蛭螺科贝类物种全部有效区分开。另外, 通过 COI 和 16SrRNA 基因构建的邻接树可以看出, 7 个物种都以较高的支持度形成了单系群。因此, COI 和 16SrRNA 两种基因序列都可以作为蛭螺科贝类 DNA 条形码标准基因用于物种鉴定。值得提及的是, 在对目标序列进行扩增时, 用于 COI 基因的 Folmer 等 (1994) 通用引物并不能对所有个体进行成功扩增, 而所有样品的 16S rRNA 基因使用 Palumbi (1996) 的通用引物均能够被成功扩增, 表明在开展蛭螺科物种的分子鉴定时, 使用 16S rRNA 基因序列可能更快速。

DNA 条形码技术相对于传统的形态分类最大的优势在于, 可以很容易地鉴定缺少形态数据或因变异而导致形态上不易区分的种类 (Hebert *et al.*, 2004b)。蛭螺科同属的近缘种的贝壳形态、颜色十分相似, 如齿纹蛭螺 *N. yoldii* 和日本蛭螺 *N. japonica*, 奥莱彩螺 *C. oualaniense* 和多色彩螺 *C. sowerbianum* 这两组同属的种类, 应用形态分类学很可能导致鉴定错误, 而本研究中应用 COI 和 16S rRNA 基因都可以将这两个组合准确区分。

基于 COI 和 16S rRNA 基因拼接序列的最大似然树显示, 蛭螺属 *Nerita* 4 个物种聚为一支 (支持度 100%), 这与 Chee 等 (2016)、Fukumori 等 (2016) 的研究结果相一致, 其中齿纹蛭螺 *N. yoldii* 和日本蛭螺 *N. japonica* 体现了很近的亲缘关系; 彩螺属 *Clithon* 和游螺属 *Neripteron* 所在的游螺亚科以 100% 的支持度形成单系, 与蛭螺属 *Nerita* 所在的蛭螺亚科 Neritinae 互为姊妹群。由于本研究物种数较少, 针对它们之间的亲缘关系和分类地位, 需要采集更多物种、应用多

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

本研究表明 DNA 条形码能够在种水平上将蛭螺科贝类进行区分, 这为应用 DNA 条形码来探讨我国沿海不同生境蛭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蛭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 条形码在中国沿海缢蛭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. 蛭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 Biology, 161(1): 213—227
- Fukumori H, Itoh H, Kano Y, 2016. The complete mitochondrial

- 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, Zemplak 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 *Astrartes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(41): 14812—14817
- Hofmann T, Knebelberger 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: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 32(1): 268—274
- Okutani T, 2017. *Marine Mollusks in Japan*. 2nd ed. Tokyo: Tokai University Press
- Padula V M, Causey D, López J A, 2017. Mitochondrial DNA phylogeography of least cisco *Coregonus sardinella* in Alaska. *Journal of Fish Biology*, 90(3): 1001—1020
- Palumbi S R, 1996. Nucleic acids II: the polymerase chain reaction. In: Hillis D M, Moritz C, Mable B K eds. *Molecular Systematics*. Sunderland: Sinauer Associates, 205—247
- Schütt H, Şeşen R, 1992. The genus *Theodoxus* in South-western Anatolia, Turkey (Gastropoda, Prosobranchia, Neritidae). *Zoology in the Middle East*, 6(1): 63—68
- Sheth B P, Thaker V S, 2017. DNA barcoding and traditional taxonomy: an integrated approach for biodiversity conservation. *Genome*, 60(7): 618—628
- Spencer H G, Waters J M, Eichhorst T E, 2007. Taxonomy and nomenclature of black nerites (Gastropoda: Neritimorpha: *Nerita*) from the South Pacific. *Invertebrate Systematics*, 21(3): 229—237
- Tamura K, Stecher G, Peterson D *et al*, 2013. MEGA6: molecular Evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12): 2725—2729
- Tan S K, Clements R, 2008. Taxonomy and distribution of the neritidae (Mollusca: Gastropoda) in Singapore. *Zoological Studies*, 47(4): 481—494
- Thompson F G, 1980. Proserpinoid land snails and their relationships within the Archaeogastropoda. *Malacologia*, 20(1): 1—33
- Underwood A J, 1976. Food competition between age-classes in the intertidal neritacean *Nerita atramentosa* Reeve (Gastropoda: Prosobranchia). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 23(2): 145—154
- Underwood A J, 2004. Landing on one's foot: small-scale topographic features of habitat and the dispersion of juvenile intertidal gastropods. *Marine Ecology Progress Series*, 268: 173—182
- Waters J M, King T M, O'Loughlin P M *et al*, 2005. Phylogeographical disjunction in abundant high-dispersal littoral gastropods. *Molecular Ecology*, 14(9): 2789—2802
- Winnepeninckx B, Backeljau T, De Wachter R, 1993. Extraction of high molecular weight DNA from molluscs. *Trends in Genetics*, 9(12): 407
- Woods A J C, Saul L R, 1986. New Neritidae from southwestern North America. *Journal of Paleontology*, 60(3): 636—655

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

ZHANG Xiao-Jie, KONG Ling-Feng, LI Qi

(The Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education; Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract DNA barcoding is not only providing an efficient method for species-level identification but also helpful in taxonomy and biodiversity. This study is aimed at assessing whether DNA barcode can efficiently distinguish the species of Neritidae along the coast of China. We sequenced partial sequences of mitochondrial COI and 16S rRNA genes from 61 individuals of 7 species of 3 genera. Our analysis showed that K2P-distances based on COI between conspecific sequences varied from 0.00% to 1.29% (0.67% on average), distances between congeneric sequences were from 4.62% to 19.25% (13.02% on average); K2P-distances based on 16S rRNA between conspecific sequences varied from 0.00% to 0.48% (0.23% on average), distances between congeneric sequences were from 2.47% to 8.48% (6.37% on average), and all conspecifics clustered together in the phylogenetic trees. These evidenced that the Neritidae species can be distinguished by DNA barcoding based on the COI and 16S rRNA gene sequences.

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