

2012 NIAN ZHONGGUO SHUICHAN XUEHUI XUESHU NIANHUI
LUNWEN XUANJI

2012年中国水产学会学术年会 论文选集

中国水产学会 编

 海洋出版社

2012 年中国水产学会学术年会 论 文 选 集

中国水产学会 编

海洋出版社

2013 年·北京

图书在版编目(CIP)数据

2012 年中国水产学会学术年会论文选集 / 中国水产学会编. —北京: 海洋出版社, 2013. 9
ISBN 978 - 7 - 5027 - 8662 - 5

I. ①2… II. ①中… III. ①渔业 - 中国 - 文集
IV. ①S9 - 53

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2013)第 224113 号

责任编辑:高朝君

责任印制:赵麟苏

海洋出版社 出版发行

<http://www.oceanpress.com.cn>

北京市海淀区大慧寺路 8 号 邮编: 100081

北京华正印刷有限公司印刷

2013 年 9 月第 1 版 2013 年 9 月北京第 1 次印刷

开本: 787mm × 1092mm 1/16 印张: 14.50

字数: 370 千字 定价: 68.00 元

发行部: 62132549 邮购部: 68038093 总编室: 62114335

海洋版图书印、装错误可随时退换

目次

基础水产生物

基于新腹足目的三种 DNA 条形码分析方法的研究
..... 邹山梅 李 琪(1)

基础水产育种

几种体色锦鲤鳞片 and 鳍条上色素细胞的观察
..... 熊 钢 王 宇 王晓清 等(19)

金鱼微卫星 DNA 的筛选、引物设计及应用
..... 杨 璞 梁拥军 孙向军 等(26)

张家口坝上高背鲫鱼红细胞大小及 DNA 含量与染色体数的关系
..... 陈 力 赵春龙 黄海枫 等(34)

张家口坝上高背鲫肌肉营养成分分析及营养价值评价
..... 韩青动 陈 力 傅 仲 等(43)

张家口坝上高背鲫鱼 DNA 含量及细胞周期分析
..... 韩青动 陈 力 穆淑梅 等(56)

水产增养殖

盐度对点篮子鱼存活、生长和摄食的影响
..... 王 好 赵 峰 庄 平 等(61)

吉丽罗非鱼和南美白对虾混养技术
..... 佟延南 王德强 李芳远(67)

利用网箱开展加州鲈鱼无公害高产养殖技术研究
..... 魏明伟 何军功 杨 起(71)

水产品贮藏与加工

南极磷虾甲壳质晶体结构和热学性质研究
..... 王彦超 薛长湖 常耀光(75)

低盐鱼糕新工艺:鱼糜 pH - shifting 工艺及微波加热胶凝
..... 付湘晋 李忠海 林亲录(89)

生物防腐剂在水产品保鲜中的研究进展

..... 朱丹实 励建荣 冯叙桥 等(96)

冷冻处理对风干蒙古红鲮腌制和干燥特性的影响

..... 李慧兰 杨杰静 刘友明 等(101)

茶多酚对黏质沙雷氏菌抑菌机理初步研究

..... 仪淑敏 励建荣 李学鹏 等(108)

水产鱼类保鲜技术研究进展

..... 刘剑侠 李婷婷 李学鹏 等(115)

市售鱼糜制品微生物菌相分析

..... 王雪琦 仪淑敏 励建荣(124)

中国对虾冷藏过程中品质变化与评价

..... 李学鹏 励建荣 王彦波 等(132)

水产品中微生物风险评估与安全标准

..... 白凤翎 李学鹏 励建荣(145)

鳃和草鱼鱼糜热诱导凝胶性能的比较研究

..... 丁玉琴 刘 茹 熊善柏(151)

鲍鱼内脏多糖促 HepG2 细胞增殖及替代培养基中血清作用的研究

..... 武凤娟 李国云 刘春花 等(161)

基础水域生态

莱州湾鱼类种类组成及季节变化

..... 郑 亮 李 凡 吕振波 等(168)

套子湾及其邻近海域春季游泳动物群落结构

..... 王田田 李 凡 吕振波 等(179)

应用多重模型推论估计北部湾多齿蛇鲻的生长参数

..... 侯 刚 刘金殿 冯 波 等(194)

应用氮稳定同位素技术研究北部湾多齿蛇鲻摄食生态

..... 冯啟彬 颜云榕 卢伙胜 等(205)

挺水植物根系对底泥抗蚀作用的实验研究

..... 金 晶 张饮江(219)

基础水产生物

基于新腹足目的三种 DNA 条形码 分析方法的研究

邹山梅 李 琪

(中国海洋大学, 山东 青岛 266003)

摘要: 近几年, DNA 条形码, 作为一种对物种进行快速鉴定的分子方法, 受到了学界的广泛认可。最初, 单系法和距离法被应用于 DNA 条形码分析。最近, 特征法被提出来。此研究中, 为了检测三种 DNA 条形码分析方法的有效性, 我们对新腹足目 (Neogastropoda) 贝类物种的 COI 和 16S rDNA 序列进行了分析。基于两条序列的分析结果显示: ①距离分析法不能有效地区分大部分种类; ②种内和种间距离出现明显的重叠区。COI NJ 树可以有效地区分大部分种类。对于 COI 和 16S rDNA 基因, 特征分析法可以正确鉴定所有研究的新腹足目种类, 并且可以有效区分一些属。此研究证明 DNA 条形码特征分析方法可以对不同水平的物种界元进行有效地区分和鉴定, 特别是对于近缘物种。另外, 特征法也可以使用相对保守的基因片段。

关键词: DNA 条形码; 单系法; 距离法; 特征法

1 引言

近几年, DNA 条形码被提出作为一种快速又简便的物种鉴定方法, 即利用一段标准 DNA 序列对物种进行区分鉴定, 特别是有效区分一些形态相似的近缘种^[1~6]。对比 DNA 条形码数据库, 获得的未知生物个体或产物可以被识别鉴定。从这个意义上讲, 利用 DNA 条形码方法鉴定物种的概念要清楚地区分于利用 DNA 序列信息进行物种分类和多样性研究的概念 (例如基于 DNA 序列的 DNA 分类)^[7~9]。截至目前, DNA 条形码获得了广泛的认可和应用, 有超过 1 000 个已发表的文章涉及其应用^[10]。

树形分析法是目前 DNA 条形码的主要分析方法, 其可以分为两种: 距离分析法和单

基金项目: 国家高技术研究发展计划项目 (2007AA09Z433); 教育部培育资金项目 (707041)

通信作者: 李琪。E-mail: qili66@ouc.edu.cn

系分析法。距离分析法是基于种内和种间距离的差异度。单系分析法以每个种类在进化树上形成单源枝为成功鉴定标准^[2]。距离分析法通过计算出物种间序列差异度而建立一个距离鉴定体系。此鉴定体系中最重要的是距离界值阈,并根据此距离界值阈来判定一个未知种类是否为新种。另外一些学者^[11,12]提出以“Barcoding gap”作为标准来进行物种鉴定^[13-15]。“Barcoding gap”即种内序列和种间序列的距离缺口。然而,距离分析法并不是一种很好的鉴定和发现新物种的方法^[9,16,17]。一个原因是线粒体 DNA 的碱基置换率在同一种内和不同种的个体间的差异度很大。这种大的差异度可以导致种内和种间序列距离的重叠^[9,17-19],进而影响序列鉴定的准确性^[13,20,21]。单系分析法以进化树上的物种是否为单源为标准来鉴定此物种是否为已知种或新种。同举例分析法一样,单系分析法也遭受到了质疑。例如,所研究样品的不足易导致进化树拓扑结构的不同^[22,23]。由于演化时间的不足,一些近缘种可能互不为单系群^[24,25]。另外,基因序列树和真正的物种进化树往往是不一致的^[15,26,27],并且以单系作为标准来进行物种鉴定缺乏客观性^[23,28,29]。

特征分析法被最新提出来作为代替距离法和单系法的新的 DNA 条形码分析方法^[16,21,23,30]。此方法是根据同一类群个体具有区别于其他类群个体的碱基特征的概念而提出的^[31]。它以物种独特的碱基组合代替序列距离对物种进行特征描述。一个物种独特的碱基组合为此物种基因序列上特定位置上的 A、T、C、G 四种碱基。特征分析法可以利用多基因位点对不同水平的分类界元进行鉴定^[21]。目前,相关研究已证实了此种分析方法在物种鉴定和发现新种的有效性,比如对果蝇和蜻蜓目昆虫的研究^[21,23,32]。

本研究通过对具有多水平分类界元(种、属、科)的新腹足目进行条形码分析来检测以上三种条形码分析方法的有效性。广泛的分类界元可以允许我们在一个宽泛的种的水平上来分析平均序列距离和碱基特征。当 COI 基因被用作单一的标准基因进行条形码鉴定时^[2,11,33-36],相关学者提出其局限性^[19,37,38]。本研究中,我们利用 COI 和 16S rDNA 两个基因位点对新腹足目进行条形码分析。

新腹足目(Neogastropoda)隶属于腹足纲,是一个物种及其丰富的海洋群体(大约有 16 000 个种类),其分布遍布海洋环境的每一个角落^[39,40]。它包含许多极具多样性和生态重要性的科目,比如骨螺科、滨螺科和宇螺科,并且具有一套成熟的形态鉴别体系^[40-45]。然而,由于该目的极大形态可塑性和外部形态易受环境影响等因素,其基于形态特征的物种分类变得极其困难。另外,许多科目包含大量的近缘种,也加剧了鉴定困难。因此,新腹足目可以作为理想的材料来检测 DNA 条形码的有效性。通过检测 DNA 条形码在新腹足目物种分类方面的可行性,我们可以清楚地知道如何运用 DNA 序列进行物种鉴定。

2 研究方法

2.1 样品采集

我们分析了新腹足目 12 科 25 属 40 种的 113 个个体的 COI 和 16S rDNA 序列(表 1)。所有研究个体是 2003—2010 年从中国沿海的 31 个地点采集的,并保存在 90%~100% 的酒精中(表 1,图 1)。

表 1 本研究中的物种

科	属	种	种名缩写	个体数
Buccinidae	<i>Buccinium</i>	<i>pemphigum</i>	Bp	6
		<i>yokomaruuae</i>	By	4
	<i>Phos</i>	<i>senticosus</i>	Ps	5
	<i>Cantharus</i>	<i>melanostomus</i>	Cm	2
		<i>cecillei</i>	Cc	2
	<i>Volutharpa</i>	<i>ampullacea perryi</i>	Va	5
	<i>Neptunea</i>	<i>cumingi</i>	Nc	3
Columbellidae	<i>Euplica</i>	<i>scripta</i>	Es	3
	<i>Pseudamycla</i>	<i>formosa</i>	Pf	1
	<i>Mitrella</i>	<i>bicincta</i>	Mb	5
		<i>burchardi</i>	Mbu	2
Melongenidae	<i>Hemifusus</i>	<i>colosseus</i>	Hc	2
		<i>ternatanus</i>	Ht	5
		<i>tuba</i>	Htu	8
Muricidae	<i>Chicoreus</i>	sp.	Cs	1
		<i>torrefactus</i>	Ct	2
	<i>Boreotrophon</i>	<i>xestra</i>	Bx	4
	<i>Thais</i>	sp.	Ts	1
	<i>Ergalatax</i>	<i>margariticola</i>	Em	2
				2
	<i>Ceratostoma</i>	<i>rorifluum</i>	Cr	2
				4
	<i>Morula</i>	<i>rugosa</i>	Mr	2
		<i>granulata</i>	Mg	4
<i>margariticola</i>		Mm	1	
Nassariidae	<i>Nassarius</i>	<i>siquijorensis</i>	Zs	1
		<i>hepaticus</i>	Nh	4
		<i>festivus</i>	Nf	3
Fasciariidae	<i>Fusinus</i>	<i>ongicaudus</i>	Fl	4
Volutidae	<i>Melo</i>	<i>melo</i>	Mme	4
Babyloniidae	<i>Babylonia</i>	<i>lutosa</i>	Bl	1
		<i>areolata</i>	Ba	4
Conidae	<i>Conus</i>	<i>aristophanes</i>	Ca	2
		<i>textile</i>	Cte	1
		<i>betulinus</i>	Vt	2
		<i>sanguinolentus</i>	Csa	1
Turbinellidae	<i>Vasum</i>	<i>turbinellus</i>	Vt	2
Terebridae	<i>Duplicaria</i>	<i>dussumieri</i>	Dd	1
Turridae	<i>Turricula</i>	<i>javana</i>	Tj	1
	<i>Gemmula</i>	<i>deshayesii</i>	Gd	1
	<i>Lophiotoma</i>	<i>leucotropis</i>	Ll	1

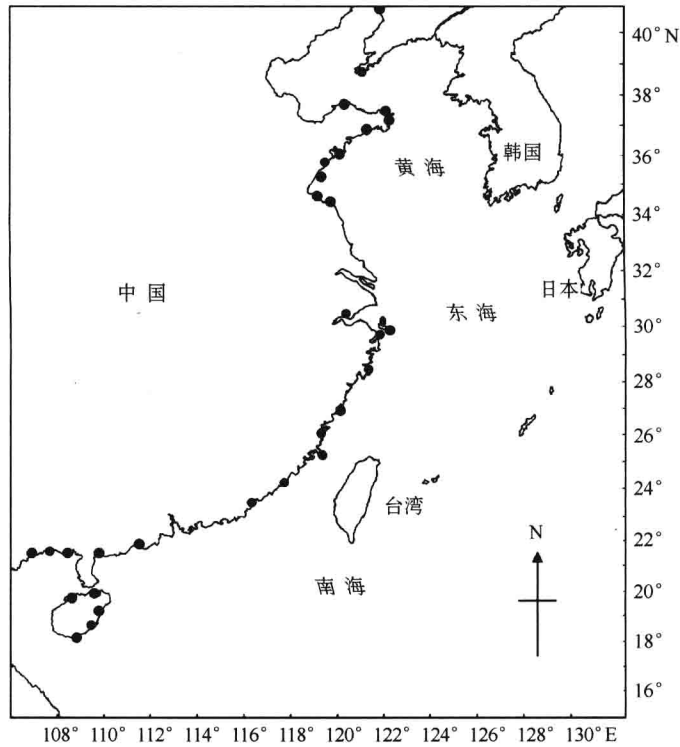


图1 本研究中的样品采集地点

2.2 DNA 提取, PCR 扩增和测序

利用 CTAB 提取法^[46], DNA 从研究个体的足部肌肉提取。PCR 扩增在 50 μ L 的体系中进行。该体系包含 1.5 mM $MgCl_2$, 0.2 mM 的 dNTPs, 1 mM 的正反向引物, 10 倍的 buffer 和 2.5 单位的 Taq 酶。PCR 循环体系为: 95 $^{\circ}C$ 3 分钟—退火温度 45 秒 (COI 和 16S rDNA 的退火温度为 45 ~ 50 $^{\circ}C$)—72 $^{\circ}C$ 1 分钟, 接下来 35 个循环的 95 $^{\circ}C$ 30 秒—退火温度 45 秒 (COI 和 16S rDNA 的退火温度为 45 ~ 50 $^{\circ}C$)—72 $^{\circ}C$ 1 分钟, 最后 72 $^{\circ}C$ 10 分钟。COI 的 PCR 扩增引物是 LCO1490 (F) - GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG 和 HCO2198 (R) - TTAACCTCAGGGTGACCAAAAAATCA^[47]。16S rDNA 的扩增引物是 16Sar - CGCCTGTTTATCAAAAACAT 和 16Sbr - CCGGTCTGAACTCAGATCACGT^[48], 16SarM - GCGGTACTCTGACCGTGCAA 和 16SbrM - TCACGTAGAATTTTAATGGTCG^[49]。PCR 产物在 1.5 倍的琼脂糖电泳上进行检测, 如果有杂带, 则进行切胶处理。然后目的产物用 EZ Spin Column PCR Product Purification Kit, Sangon 试剂进行纯化。纯化后的产物用 BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (ver. 3.1, Applied Biosystems) 和 AB PRISM 3730 进行双向测序。

2.3 序列距离和系统发育分析

用软件 Seqman II 5.07 (Lasergene, DNASTAR, Madison, WI, USA) 对 COI 和 16S rDNA 序列的正反向进行编辑和整合。然后用软件 ffitnsi (MAFFT 6.717^[50]) 对整合后的序列进行比对。在所有的 COI 序列中, 没有发现碱基插入和缺失。用 Gblocks 0.91b^[51] 软件删除

16S rDNA 序列中的不确定区域。

在 K2P 距离模型下用 MEGA 4.0^[52] 软件对 COI 和 16S rDNA 序列进行距离和进化树分析。邻接树的支持度由自检举检验 1 000 次重复而来。*Cypraea cervinetta* (Cypraeidae) 被选作为外群体。

2.4 特征法分析

我们用 CAOS^[53,54] 系统进行 DNA 条形码特征法的分析。CAOS 系统可以对所研究群体进化树的每一个节点进行特征分析。该特征可以是序列碱基、形态、生态等，其只存在于所分析进化树的一个节点上^[21]。CAOS 系统包括两个程序：P - Gnome 和 P - Elf^[53]。本研究中，PAUP v4.0b10^[55] 和 Mesquite v2.6^[56] 软件被用来产生需要在 P - Gnome 上运行的 NJ 进化树和 nexus 文件。P - Gnome 程序要求 NJ 进化树上的每一个研究单元只有一个节点，即摧毁每个单元的进化枝中所包含的小节点。此研究单元根据研究目标而定。最后，每个研究单元中区别于其他单元的独有的碱基特征被抽取出来，形成独特的条形码特征。

3 结果

本研究一共分析了 113 个新腹足目个体的 108 个 COI 和 102 个 16S rDNA 序列(表 1)。其中的 63 个 COI 和 58 个 16S rDNA 是从本研究获得的，其 Genbank 号为 JN052927 ~ JN053047。其他的 45 个 COI 和 44 个 16S rDNA 序列式从 Genbank 上下载所获得。本研究中的 97 个个体同时具有 COI 和 16S rDNA 序列。

3.1 基于距离法的条形码分析结果

本论文分析了不同分类水平的 COI 序列距离(图 2，表 2)。和期望的一样，序列距离

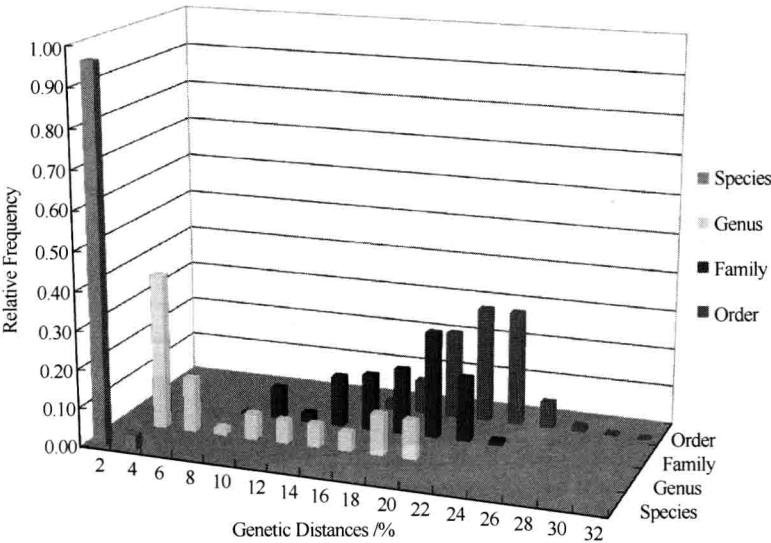


图 2 COI 基因的各个分类水平的序列距离

随着分类水平的增高而增大。同一种内个体间的 COI 序列距离分布为 0 ~ 2.20%，其平均值为 0.64%。同一属内不同种个体间的 COI 序列距离分布为 2.10% ~ 19.80%，其平均值为 8.06%。同一科内不同属个体间的 COI 序列距离分布为 6.3% ~ 24.80%，其平均值为 18.46%。不同科间个体的 COI 序列距离分布为 15.20% ~ 30.90%，其平均值为 21.61%。在 COI 的种内和种间距离之间没有出现“distance – gap”(见图 2)。10 倍的距离界值阈标准导致了 45% 的鉴定错误率。最小的种间距离(2.10% ~ 3.90%) 出现在角螺属(*Hemifusus*) 内，并且和种内距离间有重叠。

表 2 COI 不同分类水平的序列距离

类别	平均/%	最小/%	最大/%	误差
种内	0.64	0.00	2.20	0.002
属内	8.06	2.10	19.80	0.010
科内	18.46	6.30	24.80	0.017
目内	21.61	15.20	30.90	0.022

图 3 和表 3 显示了不同分类水平的 16S rDNA 序列距离。同一种内个体间的 16S RDNA 序列距离分布为 0 ~ 1.60%，其平均值为 0.20%。同一属内不同种个体间的 16S rDNA 序列距离分布为 0.30% ~ 12.40%，其平均值为 3.41%。同一科内不同属个体间的 16S RDNA 序列距离分布为 2.2% ~ 21.0%，其平均值为 9.65%。不同科间个体的 16S RDNA 序列距离分布为 6.90% ~ 30.20%，其平均值为 16.32%。因此，在 16S rDNA 序列的种内和种间距离间也出现了重叠(图 3)。10 倍的距离界值阈标准导致了 57% 的鉴定错误率。在每一个分类水平上，16S rDNA 的序列距离一般要小于 COI 的序列距离。

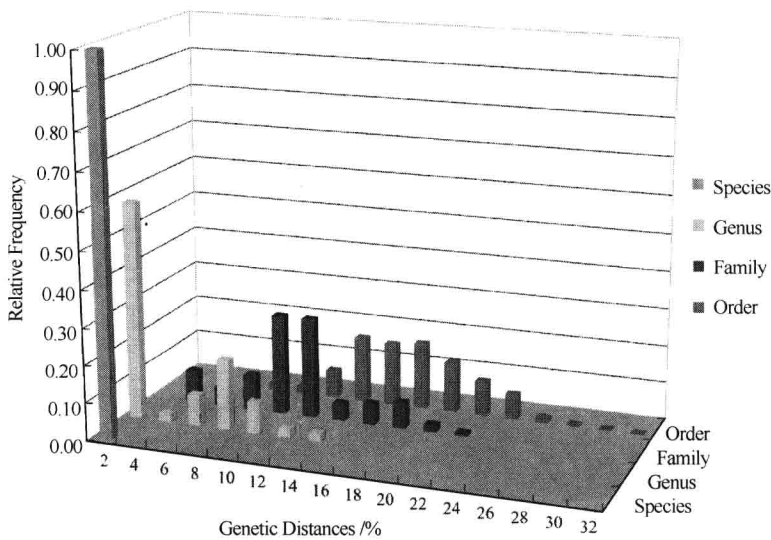


图 3 16S rDNA 基因的各个分类水平的序列距离

表 3 16S rDNA 不同分类水平的序列距离

类别	平均/%	最小/%	最大/%	误差
种内	0.20	0.00	1.60	0.001
属内	3.41	0.30	12.40	0.009
科内	9.65	2.20	21.70	0.018
目内	16.32	6.90	30.20	0.024

3.2 单系法分析结果

所有包含大于 1 个个体的物种在 COINJ 树上显示为单系群, 并具 99% 或 100% 的节点支持度 (图 4)。只包含一个个体的物种不显示支持度。3 个 *Hemifusus* 种在 COI NJ 树上显

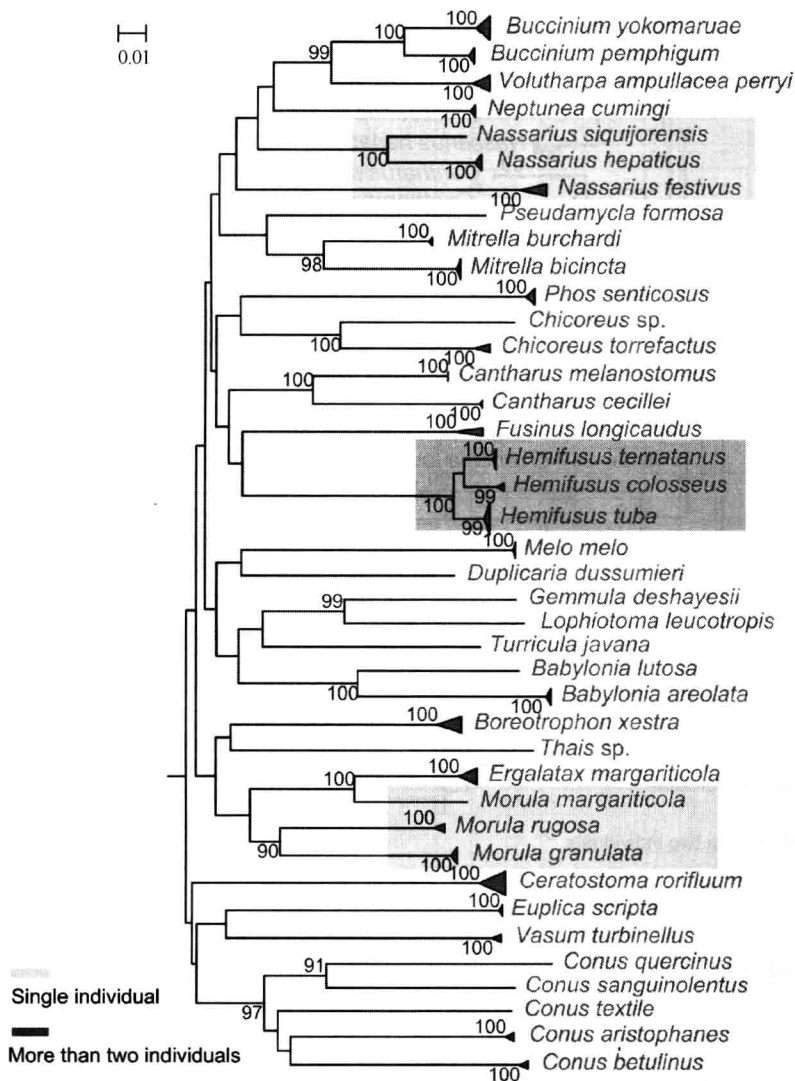


图4 COI 系统进化树

示出很近的进化关系(图 4)。除了 *H. colosseus* 和 *H. ternatanus* 聚为一个进化枝, 所有包含大于 1 个个体的种类在 16S rDNA NJ 树上也显示为单系群(图 5)。但一些种在 16S rDNA NJ 树上具较低的支持度。在 COI 和 16S rDNA NJ 树上, *Nassarius* 和 *Morula* 均不构成单系群。

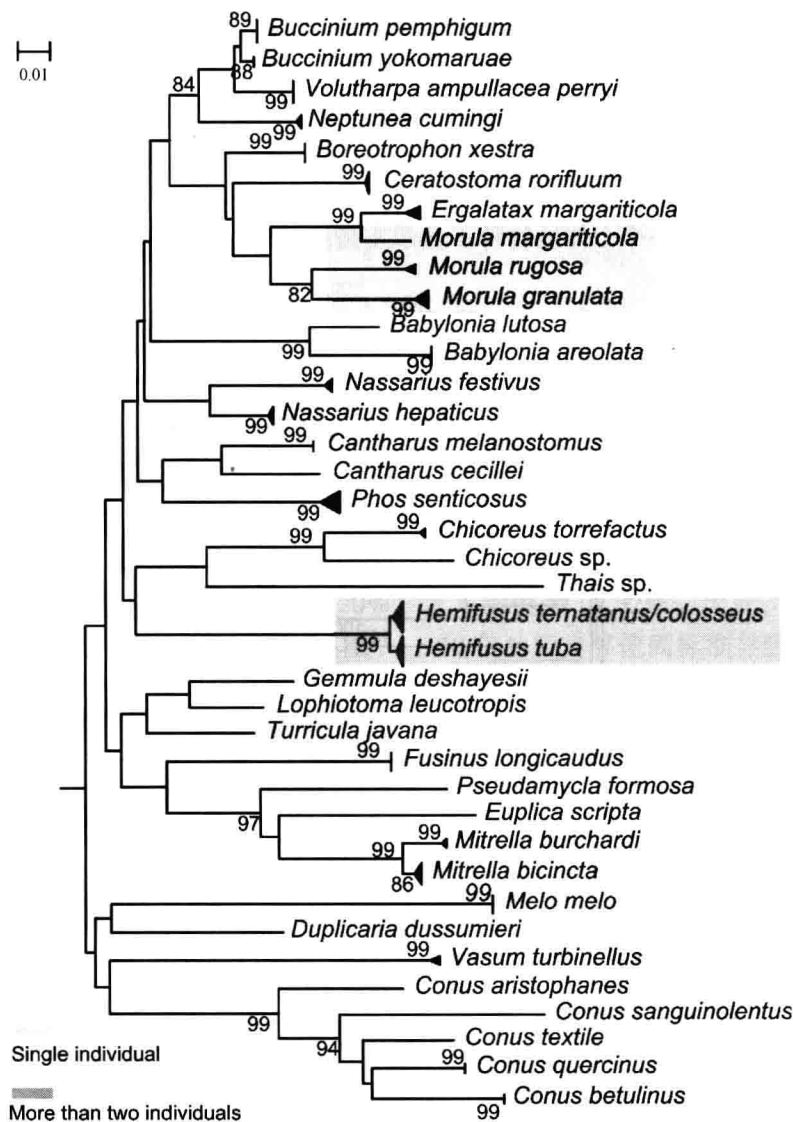


图 5 16S rDNA 系统进化树

3.3 特征法分析结果

3.3.1 种水平

在所研究的 40 个新腹足目种类的 COI 序列区, 29 个位置的特征碱基被检测到(表 4)。这些位置的特征碱基是根据节点处区别于其他类群的碱基多样性而挑选的。多样性越高,

则被挑选的可能性就越大。所有研究的种类在所挑选的 COI 序列区的 29 个位置均构成独特的碱基组合，且种至少存在 3 个特征碱基。对于近缘种 *Hemifusus colosseus*、*H. ternatanus* 和 *H. tuba*，只有 4 个特征碱基被检测到。

表 4 新腹足目 40 个种的 COI 特征法分析

	位置																															
种名	14	49	59	68	71	80	104	140	191	194	215	233	266	281	305	311	317	326	329	389	398	468	472	479	494	506	518	551	608			
Es (3)	G	A	C	A	G	T	T	A	G	A	T	T	A	A	A	A	A	G	T	A	A	C	A	A	T	T	T	T	T			
Pf (1)	A	T	T	A	A	T	T	T	A	T	C	T	A	T	T	T	T	T	G	T	G	A	T	G	A	T	G	A	T			
Mbu (2)	A	T	T	A	A	T	T	A	G	G	T	T	T	T	T	T	A	T	T	G	A	G	A	T	A	A	T	T	A			
Mb (5)	A	T	T	G	A	T	T	A	A	A	T	T	T	C ⁽²⁾ T ⁽³⁾	T	G	A	T	T	A	A	A	T	A	A	T	T	A	T			
By (4)	A	T	T	A	T	T	A	G	G	T	T	T	A	C	A	T	T	T	A	A	C	G	T	A	G	C	G	T	T			
Bp (6)	A	T	T	A	C	T	A	A	G	T	T	T	A	T	A	T	T	T	G	A	T	G	T	A	G	T	G	T	T			
Va (4)	A	T	T	A	T	T	A	A	G	T	T	A	G	C	A	T	T	T	G	G ⁽¹⁾ A ⁽³⁾	C	A	C ⁽¹⁾ T ⁽³⁾	A	A	T	G	C	T			
Nc (3)	A	T	C	T	T	T	A	A	A	A	C	A	T	T	A	T	T ⁽²⁾ C ⁽¹⁾	T	G	A	A	A	T	T	G	A	T	A	T	C		
Cm (2)	G	T	C	A	T	T	A	A	A	A	T	A	A	T	C	T	A	A	T	A	A	A	C	A	A	T	A	T	T			
Cc (2)	A	C	C	A	T	T	A	A	G	A	T	A	A	T	G	T	T	A	T	A	A	A	C	A	A	T	G	T	T			
Ps (4)	A	T	T	T	T	T	G	T	T	G	C	A	T	G	A	T	T	T	T	G	G	A	C	A	A	A	T	T	T			
Bl (1)	A	T	T	G	A	A	A	A	C	A	T	A	T	T	C	T	A	C	T	T	T	A	T	A	A	T	A	A	T			
Ba (4)	A	T	T	G	A	A	A	A	T	A	G	A	T	G	T	C	A	T	T	T	T	A	T	A	A	T	A	G	T			
Ht (5)	A	T	T	T	A	T	A	A	A	G	T	T	A	C	T	T	T	T	T	G	A	G	A	T	A	A	A	C	A	C		
Hc (2)	G	T	T	T	A	T	A	A	A	G	T	T	A	T	T	T	T	T	T	G	G	G	A	T	A	A	A	C ⁽¹⁾ T ⁽¹⁾	G	C		
Htu (8)	A	T	T	T	A	T	A	A	A	G ⁽⁷⁾ A ⁽¹⁾	C	T	A	T	T	T	T	T	T	G ⁽⁴⁾ A ⁽⁴⁾	A	G	A	C	A	A	A	C	A	T		
Vt (2)	G	G	C	T	T	A	G	G	G ⁽¹⁾ A ⁽¹⁾	A	T	A	T	C	T	T	G	T	G	T	A	A	C	T	G	T	G	G	C			
Mme (4)	C	G	T	A	T	T	A	G	G	T	G	C	T	T	A	T	G	A	G	T	A	A	T	G	A	T	G	A	T			
Cq (2)	A	T	G	G	A	A	T	G	A	T	A	A	T	T	T	T	T	G	A	A	G	A	T	G	A	C	A	T	T			
Cb (2)	A	T ⁽¹⁾ C ⁽¹⁾	A	G	G	A	A	A	G	T	T	A	T	T	G	C	A	A	G	A	T	A	A	T	A	A	T	C	T	T		
Cte (1)	A	T	C	G	G	A	G	A	A	T	C	G	T	A	A	A	A	A	G	A	T	A	A	T	A	A	T	G	T	T		
Csa (1)	A	C	G	G	A	A	T	A	A	T	T	A	T	T	T	T	C	A	G	G	G	A	T	A	A	C	A	T	T			
Tj (1)	A	T	C	T	T	A	A	G	G	A	G	A	T	C	A	T	A	T	A	G	G	A	T	G	A	T	T	G	T			
Gd (1)	A	G	T	T	T	T	G	A	A	A	T	A	T	T	A	T	A	A	C	A	A	A	T	A	A	T	A	G	T			
Li (1)	A	T	T	T	T	T	A	A	T	A	C	T	T	T	A	C	A	G	A	T	A	A	T	A	A	T	A	T	G			
Ca (2)	A	T	C	G	A	A	G	A	T	C	G	A	T	T	T	T	A	A	G	T	G	A	C	A	A	T	G	A	T			
Dd (1)	A	T	T	T	T	T	A	G	T	G	T	G	T	T	T	T	T	G	G	G	A	A	T	A	A	T	T	T	A			
Bx (4)	A	T	T	T	T	C	T	A	G	A	T	A	A	T	T	T	A	G	G	T	T	A	C	T	G	T	A	A	T			
Fl (2)	A	T	T	T	A	T	A	A	A	A	T	A	A	A	A	T	T ⁽¹⁾ G ⁽¹⁾	T	A	T	G	A	T	G	A	T	T	T	C			
Mg (4)	A	G	T	A	T	G	T	A	G	A	T	A	T	T	T	T	A	A	C	T	T	A	T	G	A	T	A	T	C			
Mr (2)	A	T	T	G	T	A	T	A	A	A	T	A	C	T	T	T	A	G	T	T	A	A	T	A	G	T	A	T	T			
Cs (1)	A	T	C	T	T	T	A	T	T	T	T	A	A	T	T	T	A	A	G	T	A	A	T	A	G	A	T	T	T			
Mm (1)	A	T	T	A	T	T	T	A	A	C	C	A	T	A	T	T	A	G	G	T	T	A	T	A	G	A	A	A	T			
Em (4)	A	T	T	A	T	T	C	C	A	T	T	A	T	A	T	T	A	A	A	T	T	A	T	G	G	A	A	A	T			
Ts (1)	A	T	C	A	T	C	G	G	T	A	A	T	T	T	T	T	T	T	G	A	C	T	A	C	C	G	G	G	A			
Cr (6)	A	T	C	T	T	C	G	G	A	A	T	A	A	A	T	C	A	A	G	T	A	A	T	T	G	T	G	T	T			
Ct (2)	A	T	T	C	T	T	G	A	T	A	T	A	A	A	T	T	T	A	A	T	T	A	A	T	A	A	G	A	T			
Nh (4)	A	T	C	C	T	C	T	A	T	A	G	C	A ⁽³⁾ G ⁽¹⁾	T	C	C	A	G	A	T	A	A	C	A	A	T	A	T	T			
Nf (3)	G	T	T	T	A	T	T ⁽²⁾ C ⁽¹⁾	A	A	G	G	T	A	T	T	A	A	G	A	A	A	A	T	A	A ⁽²⁾ G ⁽¹⁾	A	T	T	T			
Ns (1)	A	T	T	T	T	T	T	A	T	G	A	T	A	T	T	T	G	A	A	T	A	A	T	G	A	T	G	T	C			

注：表中显示了 COI 序列 14 ~608 位置的特征碱基。种名和表 1 中的缩写对应。括号里显示了每个位置的碱基数。

表 5 显示出所研究的 39 个新腹足目种类的 16S rDNA 序列区的 27 个位置的特征碱基。与 COI 序列区的检测结果类似，所有研究的种类在所挑选的 16S rDNA 序列区的 27 个位置均构成独特的碱基组合，且每个种至少存在 3 个特征碱基。对于近缘种 *Hemifusus colosseus*、*H. ternatanus* 和 *H. tuba*，则只有 3 个特征碱基被检测到。

表 5 新腹足目 40 个种的 16S rDNA 特征法分析

	位置																															
种名	45	89	105	120	161	176	177	178	189	193	196	199	203	204	206	210	211	214	216	249	250	281	283	287	290	365	366					
Es (1)	T	A	A	A	T	G	G	T	A	T	T	A	A	T	A	G	T	A	G	T	G	A	T	A	A	T	T					
Pf (1)	T	T	G	C	A	A	G	T	-	A	T	G	T	T	G	G	T	A	T	A	A	-	G	G	C	T	T					
Mbu (2)	T	T	G	G	A	G	G	T	A	A	T	A	A	T	G	A	T	C	A	T	G	A	A	G	C	T	T					
Mb (5)	T	T	G	G	A	G	G	T	A	T	T	A	A	T	G	A	T	T	A	T	A	A	A	G	C	T	T					
Bp (5)	A	A	T	A	G	A	A	C	A	C	C	G	A	T	A	A	T	G	A	A	A	A	C	A	A	C	T					
By (2)	A	A	T	A	G	A	A	T	A	T	C	G	A	T	A	A	T	T	A	A	A	A	C	A	A	C	C					
Va (5)	A	A	T	A	G	G	A	C	A	T	C	A	A	T	A	A	T	T	A	A	A	A	C	A	A	C	T					
Nc (3)	A	A	T	A	A	A	A	A	T	T	G	A	T	A	A	T	G	A	A	-	A	C	A	A	C	T						
Cm (2)	G	A	T	A	T	A	A	T	A	T	T	A	A	T	A	G	C	A	A	A	A	A	T	A	A	T	T					
Cc (1)	A	A	C	G	T	A	A	T	A	A	T	A	A	T	A	A	T	A	T	A	A	A	T	A	G	T	T					
Ps (5)	A	A	T	A	T	A	A	A	A	C	T	T	G	C	T	G	T	G	A	A	A	A	A	A	T	T	T					
Bl (1)	G	G	T	A	A	A	A	A	T	T	T	A	A	T	A	A	T	G	T	G	A	A	C	G	G	C	C					
Ba (4)	G	G	T	A	A	A	G	A	T	T	T	A	A	C	A	A	C	G	C	A	A	A	A	A	A	C	C					
Ht (5)	G	T	T	A	T	A	A	A	A	T	T	A	A	A	A	A	T	A	T	A	T	G	C	A	A	C	T					
Hc (2)	A	T	T	A	T	A	A	A	A	T	C	A	A	A	A	A	T	A	T	A	T	A	C	A	A	T	T					
Htu (7)	A	T	T	A	T	A	A	A	A	T	C	A	A	A	A	A	T	A	T	A	T	G	C	G	A	C	T					
Fl (4)	A	T	A	T	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	A	G	C	A	A	C	A	A	T	C	T	T	T					
Vt (2)	T	G	T	A	G	A	A	A	A	G	-	A	T	G	G	G	C	T	G	A	G	T	T	G	A	C	T					
Mme (4)	G	T	T	A	T	A	G	A	A	A	-	G	T	A	G	C	T	A	A	T	A	A	A	T	A	C	T					
Cq (2)	G	C	T	A	A	A	A	T	A	T	T	A	A	A	G	A	T	A	T	A	C	A	T	A	T	C	C					
Cb (2)	G	C	T	A	G	A	A	T	A	T	T	A	C	A	G	A	C	A	A	T	A	A	C	A	T	C	C					
Cte (1)	G	C	T	A	A	G	G	T	A	A	T	A	A	A	A	A	T	A	T	A	G	A	T	G	T	C	C					
Ca (1)	G	T	T	A	A	A	C	T	A	T	T	A	A	A	A	A	T	A	T	G	A	A	T	A	T	C	C					
Csa (1)	G	T	T	A	G	G	T	T	A	T	T	A	A	A	G	A	T	A	T	G	C	A	T	A	C	C	C					
Tj (1)	A	C	A	T	A	T	A	A	A	-	T	A	T	T	A	A	C	A	A	A	A	A	A	T	T	T	T					
Gd (1)	A	T	A	T	A	T	T	A	A	T	T	A	A	T	A	A	T	A	T	A	A	A	A	T	T	C	T					
Ll (1)	A	T	A	T	A	T	C	A	A	T	-	A	A	T	G	A	T	A	T	A	A	A	A	A	A	T	T					
Dd (1)	G	A	T	T	G	T	A	A	T	-	T	G	A	A	A	A	C	A	G	T	G	A	A	A	G	C	T					
Mg (4)	T	A	C	G	T(2) C(2)	T	A	A	G	T	A	T	A	T	A	A	C	A	A	A	C	A	A	T	G	T	T					
Mr (2)	T	A	C	G	T	C	G	A	A	T	A	T	G	T	A	A	T	A	A	G	A	A	A	T	A	C	T					
Mm (1)	T	A	T	G	A	A	A	A	A	A	C	A	T	A	A	T	A	A	T	A	A	A	A	A	A	C	T					
Bx (4)	T	A	T	A	G	T	A	T	A	A	A	A	A	T	A	A	T	A	A	A	A	A	A	C	A	C	T					
Ts (1)	A	A	C	G	A	A	C	T	T	C	A	A	-	T	A	T	G	A	A	A	A	A	A	T	A	C	T					
Ct (2)	A	G	C	A	A	A	A	T	T	A	A	C	T	T	T	T	A	A	A	A	A	G	-	A	A	T	T					
Cs (1)	A	A	C	G	A	A	A	T	C	A	A	T	A	T	T	T	A	A	A	A	T	A	A	A	A	C	T					
Cr (5)	T	A	T	A	A	A	A	T	A	A	T	T	T	C	A	T	A	T	A	A	A	A	T	A	T	T						
Em (3)	T	A	T	A	G	A	A	A	A	A	T	A	A	T	A	A	T	A	A	A	A	A	A	G	G	C	T					
Nh (4)	A	A	T	A	A	A	A	G	A	T	T	A	A	T	A	A	T	A	T	T	G	A	T	A	A	C	T					
Nf (3)	A	A	C	G	A	A	A	-	A	C	T	A	T	C	A	A	T	A	T	T	A	-	T	A	T	C	T					

注：表中显示了 16S rDNA 序列 45 ~ 366 位置的特征碱基。种名和表 1 中的缩写对应。括号里显示了每个位置的碱基数。

由于检测到较少的碱基特征，我们对 *Hemifusus colosseus*、*H. ternatanus* 和 *H. tuba* 单独形成一个数据集并进行了分析。此三个种的 COI 序列区的 30 个位置构成独特的碱基组合，且每个种至少存在 14 个特征碱基。在 16S rDNA 序列区，有 21 个位置构成独特的碱基组合，且每个种至少存在 5 个特征碱基(表 6、表 7)。此数据集的分析结果显示 COI 和 16S rDNA 序列的特征法分析可以将 *Hemifusus colosseus*、*H. ternatanus* 和 *H. tuba* 3 个近缘种清楚地区分开来。

表 6 *Hemifusus* 属 3 个种的 COI 特征法分析

	位置																																					
种名	14	44	116	119	122	152	194	209	215	242	263	275	281	291	299	300	329	353	386	389	392	411	473	515	518	551	587	599	608	641								
Hc (2)	G	A	C	G	T	T(1) C(1)	G	A	T	C	G	G(1) T(1)	T	C	A	T	G	C	C	G	A	T	T	T	T(1) C(1)	G	A	C	C	A								
Ht (5)	A	G	C	G	C	T	G	G	T	T	A	T	C	C	A	C	G	T	T	A	A	C	T	C	C	A	A	C	C	C	G							
Htu (8)	A	A	T	A	C	T	G(7) A(1)	G	C	T	G	T	T	T	G	C	A(4) G(4)	T	C	A	A(7) G(1)	C	C	T	C	C	A	G	T	T	G							

注：表中显示了 COI 序列 14 ~ 641 位置的特征碱基。种名和表 1 中的缩写对应。括号里显示了每个位置的碱基数。

表 7 *Hemifusus* 属 3 个种的 16S rDNA 特征法分析

	位置																				
种名	5	6	18	27	45	126	177	196	222	264	281	287	365	424	425	429	440	441	444	446	451
Hc(2)	T	G	C	G	A	C	G(1) A(1)	C	T	A	A	A	T	A	G	G	T	T	G	G	G
Ht(5)	T(4) C(1)	G(3) A(2)	C	G(4) C(1)	G(1) A(4)	C	A	T	A	G	G	A	C	A	G(4) C(1)	A(1) G(4)	G(1) T(4)	G(1) T(4)	G(1) T(4)	G(1) T(4)	C(1) G(4)
Htu(7)	T	G	A	G	A	T(1) C(6)	A	C	T	A	G	G	C	A(6) G(1)	G	G	T	T	T	T	G

注：表中显示了 16S rDNA 序列 5 ~ 451 位置的特征碱基。种名和表 1 中的缩写对应。括号里显示了每个位置的碱基数。

3.3.2 属水平

在所研究的新腹足目 25 个属的 COI 序列区，32 个位置的特征碱基被检测到(表 8)。此 25 个属中的 23 个属至少存在 3 个特征碱基。然而对于 *Conus* 和 *Morula* 两个属，则只检测到一个位置的特征碱基。

表 9 显示出 25 个属的 16S rDNA 序列区的 32 个位置的特征碱基。所有的属在所挑选的 16S rDNA 序列区的 32 个位置均构成独特的碱基组合，且每个属至少存在 3 个特征碱基。

4 讨论

4.1 单系法和距离法分析

距离法一直是条形码分析中一个备受争议的分析方法^[13,19,57]。如果以序列变异度作为物种演化的结果，那么以一个距离界值阈来进行物种鉴定非常具有主观性，因为其无法反映出物种进化的具体过程。例如，由于不同物种类群间的种内和种间距离总会出现重叠，所以很难界定一个标准的距离界值阈来进行物种鉴定^[10]。本研究，COI 和 16S rDNA 序列分析均未出现种内和种间距离的“barcoding gap”。相反，两种序列分析均出现了种内和种间的距离重叠区，尤其对于 16S rDNA 序列。我们发现赫伯特^[33]所提出的 10 倍距离界值阈对于本研究来说较大而不能有效区分一些近缘种。对于 COI 和 16S rDNA 序列，此 10 倍距离界值阈均导致了 50% 的物种鉴定错误率。因此，我们一定要谨慎使用距离法来进行条形码物种鉴定分析，尤其对于包含大量近缘种的物种类群，比如本研究中的新腹足目。

表 8 新腹足目各个属的 COI 特征法分析

位置																																		
属(种/n)	44	50	86	89	95	101	104	131	140	143	173	233	242	254	281	287	308	314	323	356	380	419	503	512	548	557	560	566	572	596	617	632		
<i>Euplicea</i> (1/3)	G	A	G	G	C	T	T	C	A	A	T	T	T	T	A	A	T	G	G	T	T	A	T	G	G	T	G	T	T	T	T	G		
<i>Pseudamycla</i> (1/1)	C	T	A	G	T	C	T	A	T	T	T	T	T	A	T	A	C	T	A	T	T	A	T	A	A	G	A	A	T	C	T	A		
<i>Mitrella</i> (2/7)	G	T	A	T	T/C	T	T	A	A	T	T	T/A	T/A	T	T/C	A	T	T/A	A	T	T/A	A	T	G	A	A	A	T	T	T	T/C	C		
<i>Buccinum</i> (2/10)	A	T	G	A	A/G	T	A	A	G/A	C/A	A	T	T	A/T	C/T	T	A	A	G	T/C	C/T	T	G	A	A	A	T	T	T	T	T	A		
<i>Volutharpa</i> (1/4)	A	T	A	A	A	T	A	A	A	A	A	A	T	A	C	C	A	A	A	T	T/C	T	A	A	A	C	T	A	C	T	T	A		
<i>Neptunea</i> (1/3)	A	T	A	A	A	G/A	T	A	A	A	A	T	A	T	T	T	T	A	T	A	T	A	T	A	G	T	C	T	T	C	A			
<i>Cantharus</i> (2/4)	G	T/C	A	A	T	T	A	A/G	A	A	T	A	T	A	T	C	T	A	G	A	T	T	G	A	T	A	T	A	A/G	T	T	A		
<i>phos</i> (1/4)	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	T	A	T	G	T	G	T	G	A	T	T	G	T	A	A	C	T	G	T	A	G	C
<i>Babylonia</i> (2/5)	G/A	T	C	T	T/C	A	A	T	A	T/C	A	T	T	T	T/G	T	A/G	G	T/C	T/C	C/T	T	T	A	A	A/G	A	C	T	A	T	A	T/C	
<i>Hemifusus</i> (3/15)	G/A	T	A	A	T	T	A	T	A	T	T	T	T/C	A	C	T	T	T	T	A	T	C	T	T	A	T	A	T	A	T	T	T	G	
<i>Vasum</i> (1/2)	A	G	A	T	A	A	G	T	G	T	A	T	T	A	T	C	A	A	T	T	G	T	T	G	C	G	T	G	T	T	T	T	A	
<i>Melo</i> (1/4)	T	G/C	T	T	A	A	A	A	G	T	T	C	A	C	T	T	A	A	T	A	T	A	T	A	C	A	T	G	T	C	T	T	G	
<i>Turricula</i> (1/1)	T	T	A	G	T	A	A	T	G	T	T	A	T	A	C	T	G	C	A	T	A	T	A	C	A	A	T	C	T	A	T	A	A	
<i>Gemmula</i> (1/1)	T	G	A	T	T	A	G	T	A	T	T	A	A	A	T	A	A	A	A	A	C	A	T	A	A	T	A	T	A	C	T	A	A	
<i>Lophiotoma</i> (1/1)	T	T	A	G	T	A	A	T	A	T	T	A	A	A	T	A	C	G	A	A	T	C	A	T	A	T	A	G	A	T	T	T	C	
<i>Duplicaria</i> (1/1)	T	T	A	T	T	A	T	G	T	T	T	G	T	A	T	A	A	A	T	T	T	T	T	A	T	T	A	T	A	T	T	T	C	
<i>Fusinus</i> (1/2)	G/A	T	A/G	A	T	T	A	A	A	A	T	A	T	G	A	T	A	G	A	G	T	C	T	C	A	A	T	G	T	A	T	T	A	
<i>Boreotrophon</i> (1/4)	C	T	T	G	T	T	T	T	A	T	T	A	T	T	T	T	G	A	A	T	T	A	G	A	C	T	A	T	T	T	T	C	T	
<i>Conus</i> (5/7)	T/C	A	T	A	C	T	C	T	G/A	A	A/G	A/G	A/G	A	T/A	T/A	G/A	G/A	T/A	T	T	T	A	G	A	C	T	A	T	T	T	C	T	
<i>Morula</i> (3/7)	A/C	G	T	A	C	T	T	T/A	A	A	A	A	A	A	T/A	T/A	A	A	T	T	T	T	T	A	T	A	T	A	T	T	T	A	A	
<i>Chicoreus</i> (2/3)	G/A	T	A/G	A	T	T	A	T	T/C	A/G	A	A	T	A	T	A	T	T	T	T	T	T	A	T	A	T	A	A	A	A	T	T	A	
<i>Ergalatax</i> (1/4)	C	T	G	C	T	T/C	C	T	A	A	C	A	T	T	A	A	T	T/C	A	T	T	A/G	T	G	C	A	A	A	C	G	A	A		
<i>Ceratosstoma</i> (1/6)	G	T	A	A	A	T	G	A	A	A	C	A	T	G	A	T	T	A	T	A	T	A	C	T	A	T	G	T	T	T	T	A	A	
<i>Thais</i> (1/1)	C	A	A	G	A	G	A	G	A	T	T	T	T	A	T	T	A	T	A	A	G	A	G	T	A	T	T	C	T	G	A	T	A	
<i>Nassarius</i> (3/8)	A	T	T/A	T	T/A	T	T/C	A	A	T	A	C	T	C	T	A/G	A	A	A	A	T	T	A	A	A	A	T	A	A	A	A	A	T	A

注：表中显示了 COI 序列 44 ~ 632 位置的特征碱基。阴影处代表一个位置有大于 1 个碱基，斜体阴影代表此位置有多个碱基而无法识别。直线阴影标出的属代表不能清楚区分的属。