

DNA 条形码技术在水生生物分类中的研究进展

薛银刚¹, 许霞², 蔡焕兴¹, 徐东炯¹, 陈桥¹

(1. 常州市环境监测中心, 江苏 常州 213001; 2. 常州大学环境与安全工程学院, 江苏 常州 213164)

摘要: 介绍 DNA 条形码技术的相关原理和发展概况, 分析其具有的优势和所存在的局限性, 并阐述了 DNA 条形码技术在水生生物分类中的研究现状, 最后探讨了目前存在的问题并展望了其未来应用前景。

关键词: DNA 条形码; 水生生物; 分类学; 研究进展

中图分类号: X835

文献标识码: A

文章编号: 1674-6732(2012)-06-0023-04

The Research Progress of DNA Barcoding in Aquatic Taxonomy

XUE Yin-gang¹, XU Xia², CAI Huan-xing¹, XU Dong-jiong¹, CHEN Qiao¹

(1. Changzhou Environmental Monitoring Center, Changzhou, Jiangsu 213001, China; 2. School of Environmental and Safety Engineering, Changzhou University, Changzhou, Jiangsu 213164, China)

ABSTRACT: The relevant principles of DNA barcoding and development were introduced. The advantages and limitations of the DNA barcoding were then analyzed. The current research condition of DNA barcoding in aquatic taxonomic was elaborated in detail. Finally, the problems were discussed and the future applications of this technology were prospected.

KEY WORDS: DNA barcoding; aquatic; taxonomy; progress

由于形态学鉴定的局限性和传统分类学家队伍的持续缩减,水生生物分类学的发展面临着几近沉寂的尴尬^[1]。而当今世界面临维持生物物种多样性、遗传多样性和避免流行病发生等许多严峻问题,都亟需发展规范、便捷和廉价的物种鉴定方法。近年来,随着分子生物学技术和生物信息学技术的发展和运用,产生了 DNA 条形码(DNA Barcoding)技术。DNA 条形码技术是分类学中辅助物种鉴定的新技术,它代表了生物分类学研究的新方向,在生态、环境、食品等诸多领域都将会广泛的应用^[2]。

1 DNA 条形码的相关原理和发展概况

2003年,HERBERT 研究发现利用线粒体细胞色素 C 氧化酶亚基(Mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I, COI)基因中一段长度为 648 bp 的片断,能够在 DNA 水平上成功地区分物种,并且认为利用 COI 基因从分子演化的角度,将提供一种快速、便宜并且可信的分类方法^[3]。这种方法逐步发展起来并被研究者命名为 DNA 条形码技术。基于 DNA 条形码编码的分子分类系统克服了传统的

形态学分类存在的缺陷,使水生生物分类学再现勃勃生机,已成为生物分类学研究中引人注目的新方向和研究热点^[4,5]。

DNA 条形码产生的基础是现代商品零售业条形码编码系统——Universal Product Code(UPC)。UPC 一般使用 11 个数字进行排列组合,共有 1 011 种排列方式,每种排列方式对应一种商品,这样来区别各种商品。类似地,在 DNA 序列中每个碱基位点有 A、T、C、G 四种可能的情况,那么只需要 15 个碱基位点就能出现 415(大于 10 亿)种编码方式,这个数字是现存物种的 100 倍。

由于蛋白质编码基因密码子的简并性,其第三碱基位点通常不受自然选择的作用而自由变化,因此只要考虑 45 个碱基就可以获得近 10 亿种可选择的编码。由于分子生物学技术的发展,在实际研究过程中,要获得一段几百个碱基长度的 DNA 序列已经比较容易,所以根本就没有必要考虑仅仅

收稿日期:2011-10-10;修订日期:2011-11-05

作者简介:薛银刚(1981—),男,工程师,博士,从事生物监测与环境毒理学工作。

45个碱基长度的DNA序列。DNA条形码工作可以建立在一段长度为几百个碱基的基因DNA序列信息的基础之上,从理论上讲,这些碱基所提供的排列组合数目完全可以包括所有物种。理想DNA条形码检测到的同属内种间遗传差异应明显大于种内遗传差异,并在两者之间形成1个明显的间隔区,称作Barcoding gap,它是评价DNA条形码理想与否的一个重要指标^[6]。

2003年于冷泉港召开的两个小型研讨会上,分类学、分子生物学和生物信息学的专家提出利用特定DNA序列实现物种鉴定的目标。2004年5月由Alfred Sloan基金会赞助于美国华盛顿特区举办的一个关于DNA条形码的大型研讨会,创立了生命条形码联盟(the Consortium for the Barcode of Life, CBOL),大部分国家的自然历史博物馆、标本馆以及研究机构和私人机构等都加入了该组织^[7]。2004年秋,美国国家生物技术信息中心(NCBI)与CBOL签署合作关系,物种条形码的标准DNA序列及其相关数据将存档于GenBank。2005年2月,伦敦举办了第一届全球DNA条形码会议。大会对DNA条形码的分类概念与思想,实验技术的细节分析以及资料库建立等议题进行了讨论。目前,全球已有多个针对不同生物类群开展的项目,最终目的是联合各个类群的DNA条形码数据库组建一个全球生物DNA条形码数据库,此数据库将设置在公众可以登陆的DNA序列数据库GenBank中。目前,以线粒体COI基因序列为编码基础的生命DNA条形码数据库(Barcode of Life Data Systems, BOLD)中,已经有超过30万个条形码序列。国际生命条形码计划(International Barcode of Life, IBOL)已经在2009年正式开始启动,提出了基于基因片段鉴定生物物种的标准及其实施框架,中国是IBOL计划全球4个DNA条形码中心节点之一(其他3个为加拿大、美国和欧盟),主要负责亚洲生命条形码计划的实施,为亚洲其他区域节点或国家节点提供技术支持与人员培训,并将对IBOL计划未来5年实现500万个国际条形码序列参照文库的建设目标发挥重要作用^[8]。

此外,关于DNA Barcoding的大量研究报道已见诸于国际重要学术期刊上,如Nature、PNAS等^[9]。

2 DNA条形码的优势和局限性

DNA条形码不仅是传统物种鉴定的强有力补充,更由于它采用数字化形式,使样本鉴定过程能够实现自动化和标准化,突破了对经验的过度依赖,并可利用有机体的残片进行快速有效的鉴定,能够在较短时间内建立形成易于利用的应用系统。DNA条形码技术将极大地促进人类监测、了解以及利用生物多样性的能力,在生命科学、生态、环境、以及医药、食品等诸多领域都将具有广泛的应用前景。

虽然DNA条形码技术显现了巨大的优势,但仍然凸显出一些不足。基于单一线粒体COI基因位点的DNA条形码技术的局限性与其技术本身的特点是分不开的,在鉴定不同的物种类群时需要确定不同的目的基因。在鉴定珊瑚虫、水母和海葵等物种时,由于存在线粒体DNA修复体系,线粒体基因显然不适合作为条形码技术的标准基因。另外,植物的线粒体DNA因杂交和基因渗入而变异很小;真菌线粒体DNA含有内含子。对这些特殊类群的标准条形码基因的选择还有待进一步研究^[10]。

3 DNA条形码在水生生物分类鉴定中的应用

随着DNA条形码技术的推进,其在水生生物分类中的应用也越来越广泛。研究表明,DNA条形码在水生生物包括鱼类、甲壳类、软体动物、藻类等分类方面具有重要应用价值。

3.1 鱼类

DNA条形码在鱼类的开发和应用较为广泛。FISH-BOL组织旨在建立所有鱼类将近30000个种的鱼类DNA条形码数据库,重点对15000种海鱼的DNA条形码数据进行收集,目前已经获得2538种鱼类的DNA条形码数据。

WARD等对澳大利亚200多种海洋鱼类和北大西洋、地中海和澳大利亚南部海域的15种鱼进行COI基因的比较,发现所有物种都能被有效区分,研究认为COI作为海洋鱼类的DNA条形码标准序列是可行的^[11,12]。ZEMLAK等用COI基因研究了印度洋沿岸35种鱼的229个体,发现南非和澳大利亚海域的同种鱼类存在很大的差异,揭示了大量隐存种的存在^[13]。近年来国内也有研究报道

指出基于线粒体 COI 基因能有效地实现对鲤科鲌属鱼类、石首鱼科、鲳属鱼类、中国鲚属、亚东鲑科鱼类、澳洲宝石鲈等鱼类的分类鉴定^[14-19]。

3.2 甲壳类

DNA 条形码在甲壳类动物中的应用也很广泛。BUCKLIN 等对 40 种磷虾的 COI 基因进行序列分析,发现 DNA 条形码能用于磷虾类的物种鉴定^[20]。RADULOVICI 等对圣劳伦斯河河口和海湾的 460 种海洋甲壳类进行了 COI 分析,在所研究的 507 个个体中,种间差异比种内差异高 25 倍,95% 的个体序列差异和形态一致,并发现 4 个种类存在隐存种^[21]。麦维军等对中国沿海 13 种对虾科动物的 16S rRNA 和 COI 基因部分序列进行了分析,中国沿海对虾科 6 属 13 种,形成 3 个明显的分支,这 3 支分别隶属新对虾属、仿对虾属和原对虾属^[22]。16S rRNA 序列可能更适用于对虾属以上阶元的遗传多样性分析;COI 序列更适合对虾科种间和群体遗传多样性的研究。

3.3 软体动物

目前国际上 DNA 条形码技术对软体动物的研究还较少,仅在部分物种有报道。MIKKELSEN 等分析了 12 种双壳类的 COI 基因,结果显示种内差异和种间差异之间没有重叠,COI 可以用于鉴定双壳类^[23]。生活在深海中的帽贝形态相似、种类繁多,物种鉴定困难,JOHNSON 等分析了 20 个种类的 COI 基因,发现 COI 能够区分大部分姊妹种^[24]。律迎春等以 COI 基因作为 DNA 条形码鉴定了海参品种的可行性^[25]。沈玉帮等基于线粒体 COI 序列对紫贻贝群体遗传多样性进行研究分析^[26]。

3.4 藻类

DNA 条形码技术在藻类中的开发和应用也已逐渐受到关注。SAUNDERS 等结合其他红藻门物种的 COI 序列,分析了大型红藻 3 个群体的 46 个样品,研究发现 COI 能准确地区分形态相似的红藻,并鉴别新种^[27];LANE 等用 COI、ITS 和 RBCSP 基因研究北太平洋褐藻类 *Alaria* 属的 54 个样品,结果对于大部分种类,如果仅仅用一个 COI 基因片段不能有效鉴别,而 3 个基因片段的组合则能有效区分此类群^[28]。

4 问题和展望

水生生物分类目前还主要依赖于形态学特征,已无法满足物种鉴定需求。利用 DNA 条形码技术为分类学家鉴定新物种提供了一个契机,可以大大缓解世界范围内缺乏合格的分类学家的问题,其在保护生物学及生物多样性调查等领域有巨大的潜力。

然而,目前 DNA 条形码的推广应用也遇到了不少问题,在国内利用 DNA 条形码技术对水生生物进行分类物种鉴定的报道还较少,主要有如下几个原因:

(1) 传统的水生生物分类学家对于新兴的 DNA 条形码技术持怀疑或否定态度,思想转变较为缓慢。

(2) 国内在水生生物 DNA 条形码方面的科研项目 and 资金投入还不够,从事 DNA 条形码的相关技术人员还不多。

(3) 尽管 DNA 条形码技术能够准确的进行物种鉴定,但是确立 COI 基因在物种内变异的衡量标准还需要大量的工作。例如,珊瑚虫、水母和藻类拥有特别的线粒体 DNA,不适合作为条形码的目的基因;植物中 COI 基因的进化速率比动物的慢得多,导致用 DNA 条形码来进行鉴别困难。

随着全球气候变化、人口、生态环境、能源和粮食等问题的日益严峻,人类可持续发展对理解和认识生物多样性的要求日益迫切,物种的准确和快速鉴定作为对生物多样性资源的保护和持续利用的基础,已成为全球性的重大需求。DNA 条形码不仅是传统物种鉴定的强有力补充,而且可以使标本鉴定过程实现自动化和标准化,其发展趋势是:

(1) 结合传统的物种鉴定方法,探索、尝试新的分子标记及多个分子标记(多基因分析法)相结合来解决 COI 基因单一化的问题。

(2) DNA 条形码与 DNA 芯片技术相结合,建立高通量、低成本、快速、灵敏、准确的成套检测技术,通过快速分析一小段 DNA 分子,可以鉴定出地球上每一个植物和动物物种,如同商场中扫描仪检测 UPC 条形码的方式一样快捷。

DNA 条形码技术将使科研和环境监测工作更加高效,在中国水生生物分类鉴定中发挥更大的作用。

[参考文献]

- [1] MALLETT J, WILLMOTT K. Taxonomy: renaissance or Tower of Babel? [J]. *Trends in Ecology & Evolution*, 2003, 18 (2): 57-59.
- [2] 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: 852-855.
- [3] HEBERT P D N, CYWINSKA A, BALL S L, et al. Biological identifications through DNA barcodes [J]. *Proc R Soc Lond B*, 2003, 270: 313-322.
- [4] 彭居俐, 王绪桢, 何舜平. DNA 条形码技术的研究进展及其应用[J]. *水生生物学报*, 2008, 32: 916-919.
- [5] 王鑫, 黄兵. DNA 条形码技术在动物分类中的研究进展[J]. *生物技术通报*, 2006, 4: 67-72.
- [6] MEYER C P, PAULAY G. DNA Barcoding: error rates based on comprehensive sampling [J]. *P LoS Biol*, 2005, 3: 2229-2238.
- [7] 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*, 2010, 40(8): 043-047.
- [8] http://www.most.gov.cn/kjbgz/201010/t20101028_82977.htm
- [9] BLAXTER M. Molecular systematics: counting angels with DNA [J]. *Nature*, 2003, 421: 122-124.
- [10] AVISE J C. *Phylogeography: The history and formation of species* [M]. Cambridge (Massachusetts): Harvard University Press, 2000, 447.
- [11] WARD R D, ZEMLAK T S, INNES B H, et al. DNA barcoding Australia's fish species [J]. *Phil Trans R Soc B*, 2005, 360: 1847-1857.
- [12] WARD R D, COSTA F O, HOLMES B H, et al. DNA barcoding of shared fish species from the North Atlantic and Australasia: minimal divergence for most taxa, but Zeus Faber and Lepidopus caudatus each probably constitute two species [J]. *Aquat Biol*, 2008, 3: 71-78.
- [13] ZEMLAK T S, WARD R D, CONNELL A D, et al. DNA barcoding reveals overlooked marine fishes [J]. *Mol Ecol Resour*, 2009, 9: 237-242.
- [14] 彭居俐, 王绪桢, 王丁, 等. 基于线粒体 COI 基因序列的 DNA 条形码在鲤科鲃属鱼类物种鉴定中的应用[J]. *水生生物学报*, 2009, 33(2): 271-276.
- [15] 柳淑芳, 陈亮亮, 戴芳群, 等. 基于线粒体 COI 基因的 DNA 条形码在石首鱼科 (Sciaenidae) 鱼类系统分类中的应用[J]. *海洋与湖泊*, 2010, 41(2): 223-231.
- [16] 张凤英, 马凌波, 施兆鸿, 等. 3 种鲷属鱼类线粒体 COI 基因序列变异及系统进化[J]. *中国水产科学*, 2008, 15(3): 392-398.
- [17] 周晓楼, 杨金权, 唐文乔, 等. 基于线粒体 COI 基因 DNA 条形码的中国鲆属物种有效性分析[J]. *动物分类学报*, 2010, 35(4): 819-826.
- [18] 孟玮, 杨天燕, 海萨, 等. 基于线粒体 COI 基因序列的亚东鲑 DNA 条形码研究[J]. *水产学杂志*, 2010, 23(1): 6-9.
- [19] 张龙岗, 郭金峰, 孟庆磊, 等. 澳洲宝石鲈线粒体 DNACOI 基因的克隆与序列分析[J]. *生物技术通报*, 2011, (4): 116-119.
- [20] BUCKLIN A, WIEBE P H, SMOLENACK S B, et al. DNA barcodes for species identification of euphausiids (Euphausiacea, Crustacea) [J]. *J Plankton Res*, 2007, 29: 483-493.
- [21] RADULOVICI A E, MARIE B S, DUFRESNE F. DNA barcoding of marine crustaceans from the Estuary and Gulf of St Lawrence: a regional-scale approach [J]. *Mol Ecol Resour*, 2009, 9: 181-187.
- [22] 麦维军, 张吕平, 沈琪, 等. 中国近海 13 种对虾分子系统演化和近似种问题的研究[J]. *安徽农业科学*, 2011, 39(18): 11122-11126.
- [23] MIKKELSEN N, SCHANDER C, WILLASSEN E. Local scale DNA barcoding of bivalves (Mollusca): a case study [J]. *Zool Scripta*, 2007, 36: 455-463.
- [24] JOHNSON S B, WARREN A, VRIJENHOEK R C. DNA Barcoding of *Lepetodrilus limpet s* reveals cryptic species [J]. *J Shellfish Res*, 2008, 27: 43-51.
- [25] 律迎春, 左涛, 唐庆娟, 等. 海参 DNA 条形码的构建及应用[J]. *中国水产科学*, 2011, 18(4): 782-789.
- [26] 沈玉帮, 张俊彬, 冯冰冰, 等. 基于线粒体 COI 序列分析对紫贻贝群体遗传多样性的研究分析[J]. *海洋通报*, 2011, 30(4): 435-440.
- [27] SAUNDERS G W. Applying DNA barcoding to red macroalgae: a preliminary appraisal holds promise for future applications [J]. *Phil Trans R. Soc B*, 2005, 360: 1879-1888.
- [28] LANE C E, LINDSTROM S C, SAUNDERS G W. A molecular assessment of northeast Pacific *Alaria* species (Laminariales, Phaeophyceae) with reference to the utility of DNA barcoding [J]. *Mol Phylogen Evol*, 2007, 44: 634-648.

致谢: 本文受到国家科技重大专项 2009ZX07101-009; 2009ZX07528-002 以及江苏省环境监测基金; 常州地区水污染物的生态效应监测 (0802); 城市人工湿地不同建设方法生态效能比较研究 (0604) 的资助!