

文章编号: 1000-0615(2018)01-0001-09

DOI: 10.11964/jfc.20161210664

基于线粒体CO I的DNA条形码在对虾科种类鉴定中的研究

易 啸, 王攀攀, 王 军, 苏永全, 毛 勇*

(厦门大学海洋与地球学院, 近海海洋环境科学国家重点实验室, 福建 厦门 361102)

摘要: 对虾科包含有26个属, 约有200多种对虾, 由于同属内的对虾在形态上非常相似, 只呈现细微的差别, 因此使得只基于形态学对对虾科物种的鉴别非常困难。为确定DNA条形码技术在对虾科物种鉴别的可行性, 本研究中, 采用线粒体细胞色素c氧化酶亚基 I (CO I) 基因研究了32种对虾的核苷酸组成、对虾种间及种内遗传距离, 用邻接法构建32种对虾CO I 基因序列系统发生树。结果显示, 对虾CO I 基因组成偏倚明显, A+T含量(61.5%)显著高于G+C(38.5%)。基于Kimura双参数模型计算, 32个物种的种内平均遗传距离为0.003, 种间平均遗传距离(0.468)是种内遗传距离的156倍, 符合Hebert提出的种间遗传距离大于或等于10倍种内遗传距离的标准。在系统进化树中, 32种对虾中有30种对虾都以较高的置信度聚合成独立的分支。可见, 线粒体CO I 基因作为对虾科DNA条形码在物种的鉴别上具有很好的应用性, 可以作为形态学分类系统的必要补充和佐证。

关键词: 对虾科; DNA条形码; CO I 基因; 鉴别

中图分类号: Q 785; S 917.4

文献标志码: A

DNA条形码技术是一种利用一小段DNA序列来识别物种和发现新物种的有效工具^[1-3]。但是, 随着这项技术的使用, DNA条形码技术也引起了较多的争议, 并且它本身的一些缺陷也逐渐被发现^[4-5]。尽管如此, DNA条形码技术仍可有效应用于鉴别和发现物种^[6]、探究物种多样性^[7]、鉴别亲缘关系近的物种^[1]以及发现隐种^[8]。

对虾隶属于节肢动物门(Arthropoda)、甲壳纲(Crustacea)、十足目(Decapoda)、游泳亚目(Natantia)、对虾科(Penaeidae)。在1993年出版的《现生甲壳动物亚门最新分类系统》中被分为26个属, 共约200多种^[9-10]。它们在上广泛分布于热带与亚热带的近岸浅水海域^[11]。由于对虾种类繁多并且一些同属的对虾在形态学上非常相似, 这使得通过对虾形态上的细微差别来鉴别对虾非常困难。然而, 目前人们主要致力于

对对虾科分子系统发育的研究, 只有少量的研究采用DNA条形码技术鉴别对虾种类^[12]。

本研究中, 基于线粒体细胞色素c氧化酶亚基 I (CO I) 基因研究DNA条形码技术在鉴别对虾科32种对虾的可行性。基于线粒体细胞色素c氧化酶亚基(CO I)基因的DNA条形码技术已经成功地应用于甲壳类动物的鉴别^[13]。拟探究DNA条形码技术在对虾鉴别上应用的潜力, 为以后DNA条形码在对虾科种类鉴别中的应用奠定基础。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

研究对象包括对虾科32种对虾, 其中14种购于广西北海和福建漳州当地海鲜市场, 所有活体标本浸泡于80%~100%酒精中, 于-20 °C冰箱保存备用。另外18种对虾的CO I 基因序列从

收稿日期: 2016-12-26 修回日期: 2016-05-20

资助项目: 国家虾产业技术体系专项(CARS-48); 福建省科技厅重大专项(2016NZ0001-4); 厦门海洋经济创新发展示范项目(16CZY009SF05)

通信作者: 毛勇, E-mail: maoyong@xmu.edu.cn

GenBank下载得到, 对虾详细信息见表1。选取实验个体都根据1997年的《枝鳃虾类科属—世界中华管鞭虾(*Solenocera crassicornis*)为外群。每个对虾总科和樱虾总科虾类》专著鉴定到种^[10]。

表1 标本的详细信息

Tab. 1 Detailed information of sampled specimens

种类/组别 species/group	采集地 locations	样品数/尾 numbers of samples
周氏新对虾 <i>Metapenaeus joyneri</i> /Gp1	广西北海 GX.BH	5
刀额新对虾 <i>Metapenaeus ensis</i> /Gp2	福建漳州 FJ.ZZ	5
戴氏赤虾 <i>Metapenaeopsis dalei</i> /Gp3	广西北海 GX.BH	5
须赤虾 <i>Metapenaeopsis barbata</i> /Gp4	福建漳州 FJ.ZZ	5
高脊赤虾 <i>Metapenaeopsis lamellata</i> /Gp5	福建漳州 FJ.ZZ	5
角突仿对虾 <i>Parapenaeopsis cornuta</i> /Gp6	福建漳州 FJ.ZZ	3
哈氏仿对虾 <i>Parapenaeopsis hardwickii</i> /Gp7	福建漳州 FJ.ZZ	3
宽沟对虾 <i>Melicertus latisulcatus</i> /Gp8	广西北海 GX.BH	4
鹰爪虾 <i>Trachypenaeus curvirostris</i> /Gp9	福建漳州 FJ.ZZ	5
凡纳滨对虾 <i>Litopenaeus vannamei</i> /Gp10	福建漳州 FJ.ZZ	5
日本囊对虾 <i>Marsupenaeus japonicus</i> /Gp11	广西北海 GX.BH	5
短沟对虾 <i>Penaeus semisulcatus</i> /Gp12	福建漳州 FJ.ZZ	5
斑节对虾 <i>Penaeus monodon</i> /Gp13	福建漳州 FJ.ZZ	5
长毛明对虾 <i>Fenneropenaeus penicillatus</i> /Gp14	福建漳州 FJ.ZZ	5
中华管鞭虾 <i>Solenocera crassicornis</i>	福建漳州 FJ.ZZ	3
矛形拟对虾 <i>Parapenaeus lanceolatus</i> /Gp15	Genbank序列号KP072679.1-KP072680.1	2
长足拟对虾 <i>Parapenaeus longipes</i> /Gp16	Genbank序列号KP072681.1-KP072685.1	5
印度拟对虾 <i>Parapenaeus investigatoris</i> /Gp17	Genbank序列号KP072675.1-KP072677.1	3
长额拟对虾 <i>Parapenaeus longirostris</i> /Gp18	Genbank序列号KJ841701.1-KJ841703.1; KU324652.1-KU324654.1	6
褐美对虾 <i>Farfantepenaeus aztecus</i> /Gp19	Genbank序列号KU958162.1- KU958164.1	3
圣保罗美对虾 <i>Farfantepenaeus paulensis</i> /Gp20	Genbank序列号AF248553.1-AF248554.1	2
巴西美对虾 <i>Farfantepenaeus brasiliensis</i> /Gp21	Genbank序列号AF248550.1-AF248551.1	2
小褐美对虾 <i>Farfantepenaeus subtilis</i> /Gp22	Genbank序列号AF248555.1- AF248559.1	5
墨吉明对虾 <i>Fenneropenaeus merguensis</i> /Gp23	Genbank序列号AY143986.1-AY143990.1	5
中国明对虾 <i>Fenneropenaeus chinensis</i> /Gp24	Genbank序列号AF247770.1-AF247772.1	3
印度明对虾 <i>Fenneropenaeus indicus</i> /Gp25	Genbank序列号AY395241.1-AY395245.1	5
<i>Parapenaeus ruberoculatus</i> /Gp26	Genbank序列号KP072656.1-KP072658.1	4
澳洲拟对虾 <i>Parapenaeus australiensis</i> /Gp27	Genbank序列号KP072662.1-KP072664.1	3
<i>Parapenaeus cayrei</i> /Gp28	Genbank序列号KP072665.1-KP072666.1	2
六突拟对虾 <i>Parapenaeus sextuberculatus</i> /Gp29	Genbank序列号KP072691.1-KP072693.1	3
假长缝拟对虾 <i>Parapenaeus issuroides</i> /Gp30	Genbank序列号KR738727.1-KR738731.1	5
<i>Parapenaeus indicus</i> /Gp31	Genbank序列号KP072670.1-KP072673.1	4
欧洲沟对虾 <i>Melicertus kerathurus</i> /Gp32	Genbank序列号EF219280.1-EF219284.1	5

1.2 基因组DNA的提取、扩增以及测序

取适量对虾标本的肌肉组织样品于1.5 mL离心管中, 用PBS缓冲液反复冲洗后充分晾干并剪碎, 采用标准酚—氯仿法提取基因组DNA^[14]。用1.2%的琼脂糖凝胶电泳检测抽提的DNA, 并稀释到合适浓度进行PCR扩增。CO I基因扩增引物为DNA条形码通用引物HCOI-2198(TAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA和LCOI-1490(GGTCAACAAATCATAAAGATATTG^[15])。PCR反应采用25 μ L体系: 2.5 μ L的10 \times PCR buffer; 12.5 mmol/L MgCl₂(1.5 μ L); 10 mmol/L dNTPs (2 μ L); 各10 μ mol/L (1 μ L)的正反向引物; 约50 ng模板DNA; 1U的Taq DNA聚合酶; 加灭菌蒸馏水至25 μ L。PCR反应程序: 94 $^{\circ}$ C 2 min, 然后94 $^{\circ}$ C 45 s, 48 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 循环35次, 最后72 $^{\circ}$ C延伸5 min^[16]。PCR产物纯化后, 由华大基因公司ABIPRISM3730 XL DNA Analyzer测序仪完成序列测定工作, 测序引物为PCR扩增引物。

1.3 数据分析

利用ClustalX^[17]对序列测序结果进行比对分析, 并辅以手工校正。采用Mega 6.0^[18]软件进行数据处理及群体遗传结构分析, 计算核苷酸组成及种内和种间遗传距离, 基于Kimura双因子参数模型构建NJ系统发生树, 节点的置信度检验采用Bootstrap分析(1000个循环)。

2 结果

2.1 核苷酸组成分析

研究所用引物位于CO I基因5'端, 测序结果经过比对校正后, 将本研究得到的所有的扩增条带的长度全都截取为542 bp, 用Mega 6.0统计, 每种虾类(包括外群)序列的组成结果如表2所示。32种对虾的CO I基因片段有47个保守位点和495个突变位点, 突变碱基占全部碱基的91.3%。所有CO I基因片段中A、T、C、G的平均含量分别为31.3%、30.2%、19.5%、18.9%。A+T含量较高, 平均为61.5%。

2.2 遗传距离分析

将32种虾类的CO I基因片段的比对结果输入软件, 以中华管鞭虾作为外群, 根据序列变异和碱基转换/颠换比, 计算种间和种内的相对

遗传距离, 并构成矩阵(图1)。结果显示, *P. ruber-oculatus*和澳洲拟对虾遗传距离最小, 为0.006, 说明二者的亲缘关系较近, 而中国明对虾和刀额新对虾的遗传距离最大, 为0.800, 说明二者的亲缘关系较远。32种对虾的种内平均遗传距离为0.003, 其中除了墨吉明对虾的种内遗传距离为0.023, 稍大于Hebert等^[1]所推荐的物种鉴定最小种间遗传距离0.02, 其他31种对虾的种内遗传距离皆小于0.02。32种对虾的种间遗传距离平均值为0.468, 是种内平均遗传距离的156倍。

2.3 系统进化树

以中华管鞭虾为外群, 用邻接法构建广义32种虾类CO I基因序列NJ树。在构建NJ树时, 用Bootstrap value法检验, 1000次重复抽样得到节点的置信度以自引导值估计(图2)。

3 讨论

3.1 对虾线粒体CO I基因结构特征

对虾线粒体CO I基因的碱基突变率达到了91.3%, 这表明32种对虾的CO I基因进化速率非常快, 彼此间存在较大差异, 但32种对虾CO I基因的种内平均遗传距离适于对虾的分类鉴定^[19]。对虾CO I基因碱基组成普遍存在偏倚现象, 本实验结果与已有的相关研究结果一致^[20]。对虾CO I基因碱基组成偏倚现象符合无脊椎动物线粒体DNA碱基组成特点, 虾、蟹、贝的CO I基因也表现出相似的特性^[21-22]。

3.2 DNA条形码技术在水生生物分类鉴定中的作用

随着DNA条形码技术的推广, DNA条形码技术在多种水生生物如鱼类、甲壳类和软体动物的分类鉴定中取得了很好的成果。Ward等^[23]使用基于CO I基因的DNA条形码技术对澳大利亚海峡的200多种鱼类进行了物种鉴别分析, 研究表明DNA条形码技术在鉴别鱼类物种上具有很好的效果。柳淑芳等^[24]使用CO I基因对石首鱼科(Sciaenidae) 19属30种鱼类进行研究, 结果表明DNA条形码技术能够很好地进行石首鱼科鱼类的物种鉴定。Bucklin等^[25]对40种磷虾的CO I基因进行了分析, 通过CO I基因能够很好地将磷虾物种鉴别开来。Johnson等^[26]分析了20个帽贝种类的CO I基因, 发现通过CO I基因能够

表 2 对虾属32种虾类 COI 基因片段核苷酸组成(其中中华管鞭虾为外群)

Tab. 2 Base composition of (CO I) gene of 32 kinds of shrimp (*S. crassicornis* as outgroup)

物种 species	A	T	C	G	A+T	总长/n full length
周氏新对虾 <i>Metapenaeus joyneri</i>	34.1	26.0	19.7	20.2	60.1	530
刀额新对虾 <i>Metapenaeus ensis</i>	30.9	27.0	19.5	22.6	57.9	530
戴氏赤虾 <i>Metapenaeopsis dalei</i>	33.5	28.0	19.4	19.1	61.3	530
须赤虾 <i>Metapenaeopsis barbata</i>	33.0	29.4	17.7	19.9	62.4	530
高脊赤虾 <i>Metapenaeopsis lamellata</i>	34.3	27.1	18.9	19.7	61.4	530
角突仿对虾 <i>Parapenaeopsis cornuta</i>	29.8	27.4	18.1	24.7	57.2	530
哈氏仿对虾 <i>Parapenaeopsis hardwickii</i>	34.2	27.2	18.5	20.2	61.4	530
宽沟对虾 <i>Melicertus latisulcatus</i>	34.3	25.2	20.2	20.2	59.5	530
鹰爪虾 <i>Trachypenaeus curvirostris</i>	34.2	27.2	18.5	20.2	61.4	530
凡纳滨对虾 <i>Litopenaeus vannamei</i>	35.3	27.0	18.5	19.2	62.3	530
日本囊对虾 <i>Marsupenaeus japonicus</i>	34.6	28.0	18.8	18.7	62.6	530
短沟对虾 <i>Penaeus semisulcatus</i>	34.7	27.8	17.5	19.9	62.5	530
斑节对虾 <i>Penaeus monodon</i>	34.7	26.8	18.9	19.6	61.5	530
长毛明对虾 <i>Fenneropenaeus penicillatus</i>	34.2	26.6	18.6	20.6	60.8	530
中华管鞭虾 <i>Solenocera crassicornis</i>	28.3	31.2	24.5	16.0	59.5	494
矛形拟对虾 <i>Parapenaeus lanceolatus</i>	28.9	32.0	21.7	17.4	60.9	494
长足拟对虾 <i>Parapenaeus longipes</i>	27.5	30.8	23.7	18	58.3	494
印度拟对虾 <i>Parapenaeus investigatoris</i>	28.9	32.6	21.5	17.1	61.5	494
长额拟对虾 <i>Parapenaeus longirostris</i>	28.9	34.6	20.0	16.4	63.5	494
褐美对虾 <i>Farfantepenaeus aztecus</i>	25.1	35.8	20.4	18.6	60.9	494
圣保罗美对虾 <i>Farfantepenaeus paulensis</i>	25.8	38.8	16.9	18.5	64.6	479
巴西美对虾 <i>Farfantepenaeus brasiliensis</i>	27.0	37.9	17.3	17.7	64.9	479
小褐美对虾 <i>Farfantepenaeus subtilis</i>	26.8	37.8	17.6	17.8	64.6	478
墨吉明对虾 <i>Fenneropenaeus merguensis</i>	27.7	35.8	19.0	17.5	63.5	477
中国明对虾 <i>Fenneropenaeus chinensis</i>	27.7	37.0	17.3	18.0	64.7	479
印度明对虾 <i>Fenneropenaeus indicus</i>	38.3	26.1	16.5	19.2	64.4	522
<i>Parapenaeus ruberoculatus</i>	29.1	31.7	22.4	16.7	60.8	494
澳洲拟对虾 <i>Parapenaeus australiensis</i>	29.1	31.8	22.3	16.8	60.9	494
<i>Parapenaeus cayrei</i>	27.9	31.0	23.6	17.5	58.9	494
六突拟对虾 <i>Parapenaeus sextuberculatus</i>	29.1	31.8	22.3	16.9	60.9	494
假长缝拟对虾 <i>Parapenaeus fissuroides</i>	29.1	31.5	22.8	16.6	60.6	494
<i>Parapenaeus indicus</i>	28.5	31.3	22.9	17.3	59.8	494
欧洲沟对虾 <i>Melicertus kerathurus</i>	26.9	34.8	19.1	19.3	61.7	494

区分大部分姊妹种。基于CO I 基因的DNA条形码技术在众多水生生物的种类鉴别中的显著成

果表明, 基于CO I 基因的DNA条形码技术在水生生物研究中适用范围非常广。因此, 对水生

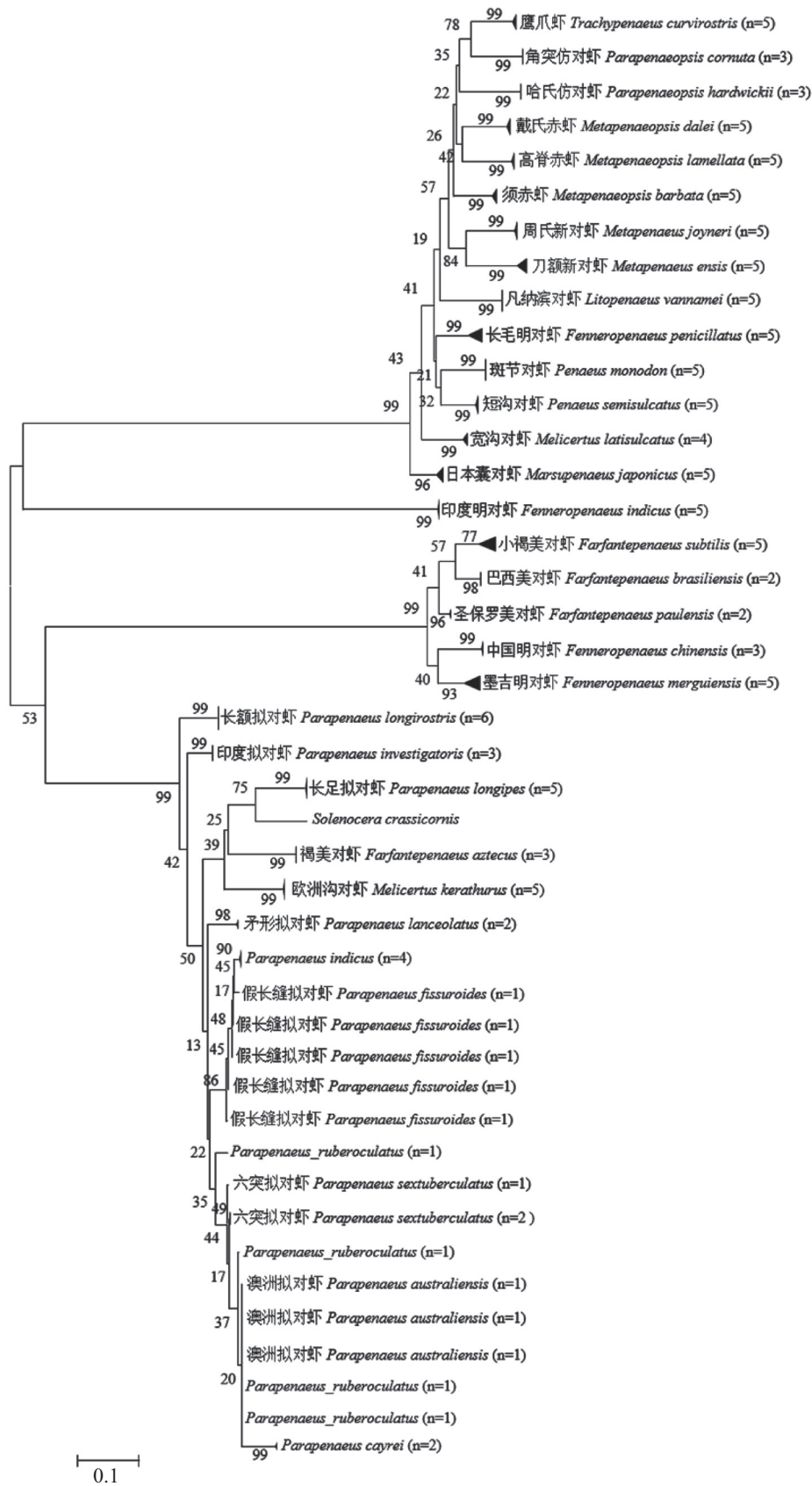


图 2 基于 CO I 序列的 NJ 树

Fig. 2 Neighbour-joining tree based on mtDNA CO I gene

感谢厦门大学海洋与地球学院的王德祥老师在形态学鉴别对虾的过程中给予的帮助!

参考文献:

- [1] Hebert P D N, Ratnasingham S, de Waard J R. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit I divergences among closely related species[J]. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2003, 270(S): S96-S99.
- [2] Waugh J. DNA barcoding in animal species: progress, potential and pitfalls[J]. *Bioessays*, 2007, 29(2): 188-197.
- [3] Zhang J B, Hanner R. DNA barcoding is a useful tool for the identification of marine fishes from Japan[J]. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2011, 39(1): 31-42.
- [4] Will K W, Mishler B D, Wheeler Q D. The perils of DNA barcoding and the need for integrative taxonomy[J]. *Systematic Biology*, 2005, 54(5): 844-851.
- [5] Ekrem T, Willassen E, Stur E. A comprehensive DNA sequence library is essential for identification with DNA barcodes[J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2007, 43(2): 530-542.
- [6] Zou S M, Li Q, Kong L F, *et al.* Comparing the usefulness of distance, monophyly and character-based DNA barcoding methods in species identification: a case study of Neogastropoda[J]. *PLoS One*, 2011, 6(10): e26619.
- [7] 宫亚运, 章群, 曹艳, 吕金磊, 杨喜书. 基于线粒体 *CO I* 基因的中国近海梭蜆属鱼类 DNA 条形码[J]. *水产学报*, 2016, 40(10): 1513-1520.
- Gong Y Y, Zhang Q, Cao Y, *et al.* DNA barcoding of *Thryssa* in coastal waters of China based on the mitochondrial cytochrome oxidase subunit I sequence[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2016, 40(10): 1513-1520(in Chinese).
- [8] Ni L H, Li Q, Kong L F, *et al.* DNA barcoding and phylogeny in the family Mactridae (Bivalvia: Heterodonta): evidence for cryptic species[J]. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2012, 44: 164-172.
- [9] Holthuis L B. The recent genera of the Caridean and Stenopodidean shrimps (Crustacea, Decapoda): with an appendix on the order Amphionidacea[M]. Leiden: Nationaal Natuurhistorisch Museum, 1993: 328.
- [10] Farfante I P, Kensley B. Penaeoid and Sergestoid Shrimps and Prawns of the World: Keys and Diagnoses for the Families and Genera[M]. Paris: Museum National d'Histoire Naturelle, 1997: 233.
- [11] Dall W, Hill B J, Rothlisberg N W, *et al.* The biology of the penaeidae[J]. *Advances in Marine Biology*, 1990, 27: 1-489.
- [12] Cheng J, Sha Z L, Liu R Y. DNA barcoding of genus *Metapenaeopsis* (Decapoda: Penaeidae) and molecular phylogeny inferred from mitochondrial and nuclear DNA sequences[J]. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2015, 61: 376-384.
- [13] Costa F O, de Waard J R, Boutillier J, *et al.* Biological identifications through DNA barcodes: the case of the crustacea[J]. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2007, 64(2): 272-295.
- [14] Green M, Sambrook J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*[M]. CSH, 2012.
- [15] Folmer O, Black M, Hoeh W, *et al.* DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates[J]. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 1994, 3(5): 294-299.
- [16] 潘宝平, 吴琪, 张素萍, 等. 文蛤属 (*Meretrix*) 16S *rRNA* 基因及 *ITS1* 序列的系统学分析[J]. *海洋与湖沼*, 2006, 37(4): 342-347.
- Pan B P, Wu Q, Zhang S P, *et al.* Molecular phylogeny of *meretrix* (Mollusca, Bivalvia) based on 16S *rRNA* genes and *ITS1* sequences[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2006, 37(4): 342-347(in Chinese).
- [17] Thompson J D, Gibson T J, Plewnia F, *et al.* The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequences alignment aided by quality analysis tools[J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(24): 4876-4882.
- [18] Tamura K, Stecher G, Peterson D, *et al.* MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0[J]. *molecular Biology and Evolution*, 2013, 30(12): 2725-2729.
- [19] Meyran J C, Monnerot M, Taberlet P. Taxonomic status and phylogenetic relationships of some species of the genus *Gammarus* (Crustacea, Amphipoda) deduced from mitochondrial DNA sequences[J]. *Molecular phylogenetics and Evolution*, 1997, 8(1): 1-10.
- [20] 刘帅, 李墨非, 叶嘉, 等. 基于线粒体 *16S rRNA* 和 *COI* 基因序列探讨对虾属 (*Penaeus*) 物种系统发生关系[J]. *生物学杂志*, 2012, 29(5): 37-42.

- Liu S, Li M F, Ye J, *et al.* The molecular phylogenetic analysis of *Penaeus* based on 16S rRNA and COI sequences[J]. *Journal of Biology*, 2012, 29(5): 37-42(in Chinese).
- [21] 陈爱辉, 李朝霞, 封功能. 基于线粒体COI基因序列的文蛤属(软体动物门: 帘蛤科)系统发育关系[J]. *动物学研究*, 2009, 30(3): 233-239.
- Chen A H, Li Z X, Feng G N. Relationships of the Genus *Meretrix* (Mollusca: Veneridae) based on mitochondrial COI gene sequences[J]. *Zoological Research*, 2009, 30(3): 233-239(in Chinese).
- [22] Harrison J S. Evolution, biogeography, and the utility of mitochondrial 16S and COI genes in phylogenetic analysis of the crab genus *Austinxia* (Decapoda: Pinnotheridae)[J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2004, 30(3): 743-754.
- [23] Ward R D, Zemlak T S, Innes B H, *et al.* DNA barcoding Australia's fish species[J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2005, 360(1462): 1847-1857.
- [24] 柳淑芳, 陈亮亮, 戴芳群, 等. 基于线粒体COI基因的数字条形码在石首鱼科(Sciaenidae)鱼类系统分类中的应用[J]. *海洋与湖沼*, 2010, 41(2): 223-232.
- Liu S F, Chen L L, Dai F Q, *et al.* Application of DNA barcoding gene COI for classifying family sciaenidae[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2010, 41(2): 223-232(in Chinese).
- [25] Bucklin A, Wiebe P H, Smolenack S B, *et al.* DNA barcodes for species identification of euphausiids (Euphausiacea, Crustacea)[J]. *Journal of Plankton Research*, 2007, 29(6): 483-493.
- [26] Johnson S B, Warén A, Vrijenhoek R C. DNA barcoding of *Lepetodrilus* limpets reveals cryptic species[J]. *Journal of Shellfish Research*, 2008, 27(1): 43-51.
- [27] Schwentner M, Clavier S, Fritsch M, *et al.* *Cyclestheria hislopi* (Crustacea: Branchiopoda): a group of morphologically cryptic species with origins in the Cretaceous[J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2013, 66(3): 800-810.
- [28] Wiens J J, Penkrot T A. Delimiting species using DNA and morphological variation and discordant species limits in spiny lizards (Sceloporus)[J]. *Systematic Biology*, 2002, 51(1): 69-91.
- [29] Hebert P D N, Stoeckle M Y, Zemlak T S, *et al.* Identification of birds through DNA barcodes[J]. *PLoS Biology*, 2004, 2(10): e312.
- [30] Burns J M, Janzen D H, Hajibabaei M, *et al.* DNA barcodes and cryptic species of skipper butterflies in the genus *Perichares* in area de conservación Guanacaste, Costa Rica[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(17): 6350-6355.
- [31] Wiemers M, Fiedler K. Does the DNA barcoding gap exist?-a case study in blue butterflies (Lepidoptera: Lycaenidae)[J]. *Frontiers in Zoology*, 2007, 4: 8.
- [32] Perez K E, Defreitas N, Slapcinsky J, *et al.* Molecular phylogeny, evolution of shell shape, and DNA barcoding in polygyridae (Gastropoda: Pulmonata), an endemic North American clade of land snails[J]. *American Malacological Bulletin*, 2014, 32(1): 1-31.
- [33] Lavery S, Chan T Y, Tam Y K, *et al.* Phylogenetic relationships and evolutionary history of the shrimp genus *Penaeus* s.l. derived from mitochondrial DNA[J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2004, 31(1): 39-49.

The research of *CO I* -based DNA barcoding in Penaeidae's identification

YI Xiao, WANG Panpan, WANG Jun, SU Yongquan, MAO Yong*

(State Key Laboratory of Marine Environmental Science, College of Ocean and Earth Sciences,
Xiamen University, Xiamen 361102, China)

Abstract: The Penaeidae comprises 26 genera and approximately 200 species as most of Penaeidae shrimps in the same genus are morphologically similar, and just exhibited subtle morphological differences, which makes identification of Penaeidae shrimps a difficult task based on taxonomic keys alone. In order to define the practicability of DNA barcoding in identification of Penaeidae shrimps, in this study, we used *CO I* gene to examine 32 kinds of Penaeidae's nucleotide composition, interspecific genetic distance and intraspecific genetic distance, and to build neighbor-joining tree of 32 kinds of Penaeidae based on mtDNA *CO I* gene. As a result, the *CO I* sequences of 32 kinds of Penaeidae present base preference. On average, the content of A+T (61.50%) was significantly higher than that of G+C (38.50%). As calculated by Kimera-2-parameter model, the mean distance within-species was 0.003, the mean distance pairwise-species (0.468) is 156 times greater than the mean distance within-species. The phylogeny showed that 30 kinds of Penaeidae from 32 kinds of Penaeidae could converge upon a monophyly with high support values. We can see the good applicability of mitochondrial *CO I* -based DNA barcoding in Penaeidae's identification and use it as a necessary complement and a test of morphological taxonomic system.

Key words: Penaeidae; DNA barcoding; *CO I* gene; identification

Corresponding author: MAO Yong. E-mail: maoyong@xmu.edu.cn

Funding projects: National Shrimp Industry Technical System Project (CARS-48); Major Projects of Science and Technology Department of Fujian Province (2016NZ0001-4); Marine Economy Innovation and Development Demonstration Project of Xiamen (16CZY009SF05)