

沙塘鳢科鱼类的 DNA 条形码及分子系统学研究*

杨承忠¹, 黄杰², 卡迪丽亚·克依木¹, 唐丹^{3,4}, 潘超^{3,4}, 徐翔^{3,4}, 杨波^{3,4}

(1. 重庆师范大学 生命科学学院 重庆市动物生物学重点实验室, 重庆 401331;

2. 商丘师范学院 生物与食品学院, 河南 商丘 476000; 3. 中国大熊猫保护研究中心;

4. 大熊猫国家公园珍稀动物保护生物学国家林业和草原局重点实验室, 四川 都江堰 611830)

关键词: DNA 条形码; COI 基因; Cytb 基因; 沙塘鳢科; 系统发育

中图分类号: Q958.9

文献标志码: A

文章编号: 1672-6693(2019)04-0137-06

随着分子生物学的快速发展和大量分子生物学数据的积累,通过分析特定基因序列来了解生物多样性及有关差异已成为物种鉴定、种间亲缘关系和物种进化研究的一种重要辅助手段。DNA 条形码(DNA barcode)技术是通过分析一个标准的目的基因序列从而对物种进行鉴定的技术。由于该技术从分子学角度来辅助物种鉴定,弥补了由于个体差异带来的形态学鉴定缺陷,因而得到了广泛应用,并且逐渐研发出更多、更高效的分子标记。在动物类群中,由于线粒体 DNA(Mitochondrial DNA, mtDNA)具有拷贝数高、结构简单、内部几乎不发生基因重组、进化速率快等优点,因此备受到广大研究者的青睐^[1-3]。此外,mtDNA 甚至在法医学鉴定中也起着重要的作用^[4]。在 mtDNA 中,COI 基因序列被证实在鸟类、鱼类、哺乳类和无脊椎动物等物种间存在 97% 的高度保守性,具备较强的种间鉴别能力^[5-8]。同时,mtDNA 中的 Cytb 基因也被广泛用于系统进化分析和物种鉴定^[9-11]。随着 GenBank 数据库中 COI 和 Cytb 基因序列数量逐渐增多、基因扩增通用引物的成功研发^[12],这两个基因都已逐渐成为重要的分子标记。

沙塘鳢科(Odontobutidae)隶属于鲈形目(Perciformes)虾虎鱼亚目(Gobioidei),是东亚特有的中、小型溪流底栖性肉食性鱼类,广泛分布于中国东部各省水域,具有一定的经济和生物学价值^[13]。沙塘鳢科根据眶下骨、巩膜骨、肩胛骨等 8 个形态学特征而建立,最初下辖 3 个属,随后又扩充至 6 个属,即:怪沙塘鳢属(*Terateleotris*)、华黝鱼属(*Sineleotris*)、新沙塘鳢属(*Neodontobutis*)、小黄黝鱼属(*Micropercops*)、鲈塘鳢属(*Perccottus*)和沙塘鳢属(*Odontobutis*)^[14-16]。然而,这些形态特征的同源性及其基于这些特征所构建的分类系统却备受争议^[14, 17-22]。在分子系统学方面,由于沙塘鳢科鱼类分子数据有限,特别是缺少一些关键物种(如怪沙塘鳢属、华黝鱼属和新沙塘鳢属的物种)的分子信息,因而各研究得到的结果并不一致^[23-26]。由此可见,沙塘鳢科物种鉴定及系统分类问题的解决有待于更多物种分子信息的获得和更有效的分子标记筛选。为此,本研究以 COI 和 Cytb 基因为分子标记,在鉴定未知种的基础上对沙塘鳢科鱼类的系统发育关系进行重建,并分析这两种分子标记在沙塘鳢科鱼类物种鉴定上的有效性,以期弄清沙塘鳢科鱼类内部的系统进化关系及筛选出适用于沙塘鳢科鱼类物种鉴定的 DNA 条形码。

1 材料与方法

1.1 材料

用于研究的 5 尾沙塘鳢未知种(*Odontobutis*?)样本于 2016 年 6 月在广东省梅州市丰顺县境内自然水体中采集。

* 收稿日期:2018-12-18 修回日期:2019-04-28 网络出版时间:2019-07-15 12:30

资助项目:国家自然科学基金(No. 31501845);重庆市自然科学基金(No. cstc2017jcyjAX0165; No. cstc2018jcyjAX0738);重庆市留学回国人员创业创新支持计划(No. cx2018108)

第一作者简介:杨承忠,男,副教授,博士,研究方向为分子进化与动物系统学,E-mail:drczyang@126.com;通信作者:杨波,男,工程师,E-mail:yangb_198701@163.com

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1165.N.20190715.1230.026.html>

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取 获取的沙塘鳢鳍条组织存于 -80°C 冻存备用。采用经典的酚-氯仿法提取基因组 DNA,用 NanoDrop 2000 超微量分光光度计和琼脂糖凝胶电泳测定 DNA 浓度及检测 DNA 完整性,并将 DNA 于 -20°C 保存备用。

1.2.2 PCR 扩增与测序 对 5 个样本的基因组 DNA 中 *COI* 和 *Cytb* 基因序列分别进行扩增。*COI* 基因扩增引物分别为 FishF1: 5'-CAACCAACCACAAAGACATTGGCAC-3', FishR1: 5'-TAGACTTCTGGGTGGC-CAAAGAATCA-3'^[7]; *Cytb* 基因扩增引物参考 GenBank 数据库中鱼类 *Cytb* 基因序列设计,分别为 F:5'-CAC-CGTTGTYRTTCAACTAC-3', R:5'-CCGRYTTACAAGAYYGGCGTTC-3'。PCR 反应体系为:10×Buffer 2.5 μL , dNTP 2.0 μL , DNA 模板 1.0 μL , 上、下游引物各 1.0 μL , Taq 酶 0.2 μL , 然后补充 ddH₂O 17.3 μL 至总体积为 25 μL 。PCR 反应程序:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 90 s,此过程运行 35 个循环;最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min,反应完成后保温 12 $^{\circ}\text{C}$ 。取 2 μL PCR 产物在琼脂糖凝胶电泳中检测,然后将有目的条带的 PCR 产物用胶回收试剂盒 Gel Extraction Kit (OMEGA, America) 纯化回收并送上海英骏生物技术有限公司测序。

1.2.3 基因序列分析及系统树构建 从 GenBank 中下载沙塘鳢科鱼类各属部分物种(表 1)的 *COI* 基因序列 24 条,联合本研究获得的 5 条序列,另将 1 条圆鳞发光鲷(*Acropoma hanedai*) (GenBank 登录号:DQ648436)的 *COI* 基因序列作为外群构建系统发育树,共计 30 条。同样地,本研究中用于分析的 *Cytb* 基因序列共 28 条,包括本研究获得的 5 条序列和其他的沙塘鳢科鱼类 *Cytb* 基因序列 22 条,另将 1 条须软鱼(*Malakichthys barbatus*) *Cytb* 基因序列(GenBank 登录号:AB104914)作为外群。通过 Clustal W 程序按照缺省参数进行序列多重比对^[27]。所选序列进行两两之间的 K2P 遗传距离的计算,计算由 MEGA 完成^[28]。利用在线软件 The CIPRES Science Gateway V. 3.1 (http://www.phylo.org/sub_sections/portal/) 构建 Maximum-likelihood (ML) 树,选用模式为 RAxML-HPC2 XSEDE (8.2.10)^[29-31]。Bayes (BI) 树在 MrBayes 3.1.2 软件中构建,位点变异设置为 invgamma 分布,序列最佳进化模型为 GTR+I+G,运行 1 000 000 代^[32]。最后用 FigTree v1.4.2 和 Photo-shop CS3 两款软件完成系统树的绘制。

2 结果

2.1 沙塘鳢科各阶元遗传距离

本研究获得的 5 条沙塘鳢 *COI* 基因序列长度均为 713 bp, *Cytb* 基因序列长度均为 1 117 bp。将序列提交至 GenBank, 样品编号分别为 HF20160501, HF20160503, HF20160504, HF20160505 和 HF20160506。与上述样品对应的 *COI* 基因登录号分别为 MK471224, MH516320, MH516321, MH516322 和 MH516323; 同样与之对应的 *Cytb* 基因登录号分别为 MK471225, MK471226, MK471227, MK471228 和 MK471229。 *COI* 基因遗传距离分析结果显示:沙塘鳢科鱼类种内的遗传距离为 0.000~0.011, 平均遗传距离为 0.003; 同属种间水平的遗传距离为 0.040~0.178, 平均遗传距离为 0.155; 属间的遗传距离为 0.214~0.252, 平均遗传距离为 0.231(表 1)。 *Cytb* 基因遗传距离分析结果显示:沙塘鳢科鱼类种内遗传距离为 0.000~0.157, 平均遗传距离为 0.022; 同属种间遗传距离为 0.068~0.261, 平均遗传距离为 0.208; 属间遗传距离为 0.251~0.331, 平均遗传距离为 0.289(表 1)。

此外,本研究中沙塘鳢未知种 5 个样品 *COI* 基因序列间遗传距离为 0.005, *Cytb* 基因序列间遗传距离也为 0.005; 沙塘鳢未知种与海丰沙塘鳢(*Odontobutis haifengensis*) *COI* 和 *Cytb* 基因序列间的遗传距离仅分别为 0.003 和 0.003, 与除海丰沙塘鳢外的沙塘鳢属其他物种 *COI* 和 *Cytb* 基因序列间的遗传距离分别为 0.159~0.178(平均值为 0.167)和 0.237~0.261(平均值为 0.249), 与其他属物种 *COI* 和 *Cytb* 基因序列间的平均遗传距离为 0.240 和 0.322(表 1)。

2.2 系统发育分析

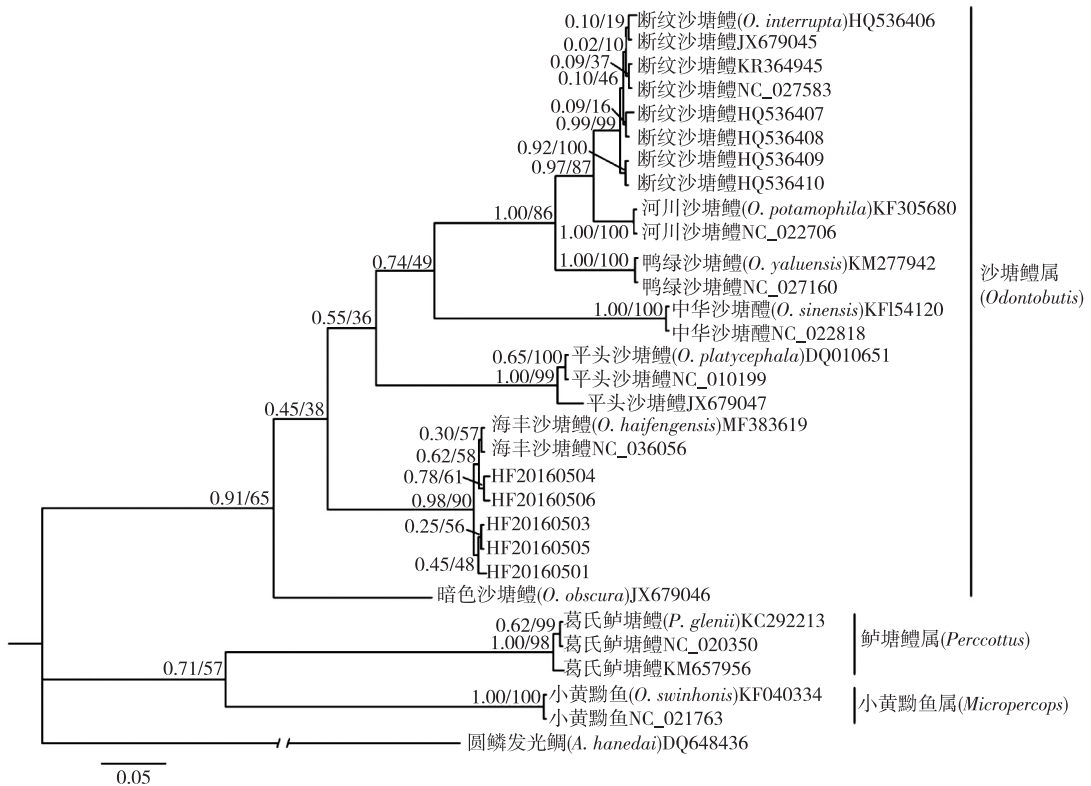
本研究中,基于 *COI* 基因构建的 ML 和 BI 树呈现出一致的拓扑结构(图 1)。沙塘鳢科所有属均为单系发生,所有物种的序列都聚在各自的属所形成的进化枝内。小黄魮鱼属与鲈塘鳢属先形成姐妹群关系,再由它们共同构成的进化枝与沙塘鳢属形成姐妹群关系。在沙塘鳢属支系内,5 条沙塘鳢未知种序列仅与海丰沙塘鳢聚在一起。暗色沙塘鳢处于沙塘鳢属支的基部,是沙塘鳢属中最早分化出来的物种。同样地,基于 *Cytb* 基因所构建的 ML 和 BI 树拓扑结构与上述结果相似(图 2),只是在沙塘鳢属分枝内呈现出差异,即处于沙塘鳢属支系的

基部位置的是中华沙塘鳢而不是暗色沙塘鳢。

表 1 基于 *COI*(左下)和 *Cytb*(右上)基因的沙塘鳢科鱼类种间和种内遗传距离

Tab.1 Genetic distances of intra/inter-species of Odontobutidae based on *COI* (lower left triangle) and *Cytb* (upper right triangle) genes

序号	物种	种间遗传距离										<i>COI</i> 种内遗传距离	<i>Cytb</i> 种内遗传距离
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
1	沙塘鳢未知种 (<i>Odontobutis</i> ?)		0.003	0.247	0.260	0.261	0.244	0.247	0.237	0.313	0.331	0.005	0.005
2	海丰沙塘鳢 (<i>O. haifengensis</i>)	0.003		0.247	0.259	0.258	0.241	0.244	0.234	0.310	0.320	0.000	0.000
3	暗色沙塘鳢 (<i>Odontobutis obscura</i>)	0.161	0.158		0.232	0.228	0.201	0.217	0.208	0.262	0.320	—	0.157
4	平头沙塘鳢 (<i>Odontobutis platycephale</i>)	0.159	0.158	0.160		0.210	0.177	0.163	0.127	0.277	0.297	0.011	0.000
5	中华沙塘鳢 (<i>Odontobutis sinensis</i>)	0.172	0.174	0.166	0.176		0.205	0.206	0.192	0.278	0.293	0.000	0.000
6	鸭绿沙塘鳢 (<i>Odontobutis yaluensis</i>)	0.178	0.175	0.162	0.178	0.177		0.115	0.100	0.255	0.295	0.000	0.009
7	河川沙塘鳢 (<i>Odontobutis potamophila</i>)	0.165	0.164	0.178	0.160	0.166	0.081		0.068	0.255	0.295	0.000	0.039
8	断纹沙塘鳢 (<i>Odontobutis interrupta</i>)	0.166	0.165	0.170	0.147	0.166	0.079	0.040		0.251	0.290	0.003	0.000
9	葛氏鲈塘鳢 (<i>Percottus glenii</i>)	0.247	0.231	0.224	0.217	0.252	0.231	0.248	0.237		0.268	0.005	0.010
10	小黄鲈鱼 (<i>Micropercops swinhonis</i>)	0.233	0.231	0.215	0.237	0.225	0.223	0.216	0.214	0.224		0.000	0.000



注:节点处数字表示支持率(BI/ML),物种名后面的字母及数字表示 GenBank 登录号,下同

图 1 基于 *COI* 序列构建的沙塘鳢科 BI/ML 系统发育树

Fig.1 Phylogenetic tree of Odontobutidae generated by BI and ML based on the *COI* gene sequences

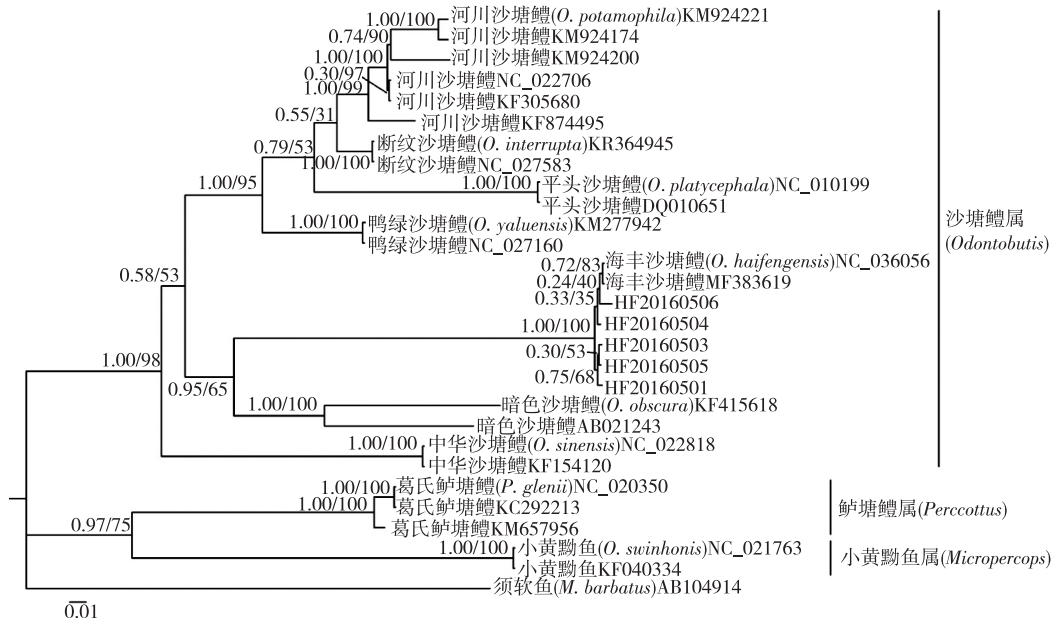


图 2 基于 *Cytb* 序列构建的沙塘鳢科 BI/ML 系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of Odontobutidae generated by BI and ML based on the *Cytb* gene sequences.

3 讨论

种间与种内遗传距离是物种鉴定的重要依据, Hebert 等人^[5]认为,物种的种内遗传距离应小于 DNA 条形码规定的最大种内遗传距离,即 0.020,且种间遗传距离至少是种内遗传距离的 10 倍。本研究中,基于 *COI* 基因的种内平均遗传距离为 0.003,种间平均遗传距离大于或等于 0.155;种间遗传距离是种内遗传距离的 52 倍以上,因此很大程度上满足了 DNA 条形码所规定的标准。此外,沙塘鳢科不同物种之间的 *COI* 基因最小遗传距离为 0.040,也大于上述的物种鉴定阈值 0.020;而种内个体间的 *COI* 基因最大遗传距离为 0.011,均小于种内水平 0.020 的阈值标准(表 1)。同样地,本研究中基于 *Cytb* 基因的种内平均遗传距离为 0.022,种间平均遗传距离大于或等于 0.209;种间遗传距离是种内遗传距离的 9.5 倍以上,基本符合 DNA 条形码的标准。另外,基于 *Cytb* 基因的种间最小遗传距离(0.068)大于物种鉴定阈值 0.020,这也符合 DNA 条形码的鉴定标准。但是,基于 *Cytb* 基因的暗色沙塘鳢和河川沙塘鳢种内遗传距离(分别为 0.157, 0.039)明显不符合要求。暗色沙塘鳢和河川沙塘鳢基于 *Cytb* 基因的种内遗传距离与本研究所涉其他物种的种内遗传距离相差甚远,甚至达到了种间遗传距离的水平。该现象出现的原因可能有二:其一,这两个种 *Cytb* 基因序列本身存在问题,如物种鉴定有误或测序过程产生偏差;其二,两物种具有独特的进化方式。因此,暗色沙塘鳢和河川沙塘鳢基于 *Cytb* 基因的相关数据还有待于今后进一步确定。综上比较,*COI* 基因在沙塘鳢科物种鉴定灵敏度上稍强于 *Cytb* 基因^[33]。相关研究也表明,动物 *COI* 基因较 *Cytb* 基因拥有更适合作为 DNA 条形码的优势:*COI* 基因序列 5'端的区域长度为 650 bp 左右,且相邻的序列保守,使得该区域易于被通用引物识别扩增^[34]; *COI* 基因序列进化速率较慢,即使如此,依据每 1 000 000 年 2% 的进化速率来计算,650 bp 序列可以提供约 13 个特征信号位点用于识别绝大多数物种^[35]。诸多研究也证实 *COI* 基因作为 DNA 条形码在两栖爬行类^[36]、昆虫类^[37]、鸟类^[5]、鱼类^[7]以及整个动物界进行物种鉴定的准确性^[38],甚至能够鉴别红藻门(Rhodophyta)一类的藻类植物^[39]。

有研究认为,mtDNA 序列的分歧程度与物种的形成过程密切相关^[5,40]。事实上,98% 的脊椎动物姐妹种之间的遗传距离都大于 0.020^[41],一些种间分歧度很低(遗传距离接近 0.020)的物种之间可能所经历的生殖隔离时间较短^[38]。本研究中,基于 *COI* 和 *Cytb* 基因序列分析显示,河川沙塘鳢、断纹沙塘鳢和鸭绿沙塘鳢三者之间的遗传距离虽然都大于鉴定阈值 0.020,但与其他物种之间的遗传距离相比要小 2 倍左右,有的甚至至少 1 个数量级。这表明三者间经历的生殖隔离时间可能较短,并具有很近的亲缘关系。基于 *COI* 基因的系统发育分析也显示:河川沙塘鳢、断纹沙塘鳢和鸭绿沙塘鳢聚为一个大的进化枝且处于整个进化树的顶部,为最晚分化的一支(图 1)。此外,虽然基于 *Cytb* 和 *COI* 基因的系统发育树有所差异,但也能体现 3 个物种之间很近的亲缘关

系(图 2)。

本研究中,5 个沙塘鳢未知种样品基于 *COI* 和 *Cytb* 基因的遗传距离均仅为 0.005,表明这 5 个样本为同一物种。5 个样本与海丰沙塘鳢基于 *COI* 和 *Cytb* 基因的遗传距离均仅为 0.003,远远小于物种鉴定阈值 0.020,故两者的遗传分化表现为种内水平。此外,5 个样本与沙塘鳢属他物种间基于 *COI* 和 *Cytb* 基因的遗传距离(0.156~0.177)表现为同属种间水平,与其他属物种基于 *COI* 和 *Cytb* 基因的遗传距离也已到达属间水平(0.233~0.245)(表 1)。不仅如此,系统发育分析结果也显示这 5 个样本仅与海丰沙塘鳢聚一起(图 1,图 2)。由此可知,本研究所获沙塘鳢未知种实际上均为海丰沙塘鳢。

参考文献:

- [1] CARRACEDO A, BAR W, LINCOLN P, et al. DNA commission of the international society for forensic genetics; guidelines for mitochondrial DNA typing[J]. Forensic Science International, 2000, 110(2): 79-85.
- [2] AVISE J C, NEIGEL J E, ARNOLD J. Demographic influences on mitochondrial DNA lineage survivorship in animal populations[J]. Journal of Molecular Evolution, 1984, 20(2): 99-105.
- [3] CRONIN M A, PALMISCIANO D A, VYSE E, et al. Mitochondrial DNA in wildlife forensic science: species identification of tissues[J]. Wildlife Society Bulletin, 1991, 19(1): 94-105.
- [4] VERMA S K, SINGH L. Novel universal primers establish identity of an enormous number of animal species for forensic application[J]. Molecular Ecology Notes, 2004, 3(1): 28-31.
- [5] 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.
- [6] HAJIBABAEI M. Design and applicability of DNA arrays and DNA barcodes in biodiversity monitoring [EB/OL]. [2018-12-18]. <https://link.springer.com/content/pdf/10.1186%2F1741-7007-5-24.pdf>.
- [7] 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.
- [8] HAJIBABAEI M, JANZEN D H, BURNS J M, et al. From the cover: DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103(4): 968-971.
- [9] IRWIN D M, KOCHER T D, WILSON A C. Evolution of the cytochrome b gene of mammals[J]. Journal of Molecular Evolution, 1991, 32(2): 128-144.
- [10] HSIEH H M. Cytochrome b gene for species identification of the conservation animals[J]. Forensic Science International, 2001, 122(1): 7-18.
- [11] SU B, WANG Y X, LAN H, et al. Phylogenetic study of complete cytochrome b genes in musk deer (Genus *Moschus*) using museum samples[J]. Molecular Phylogenetics & Evolution, 1999, 12(3): 241-249.
- [12] MEUSNIER I, SINGER G A, LANDRY J F, et al. A universal DNA mini-barcode for biodiversity analysis [EB/OL]. [2018-12-18]. <https://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-9-214>.
- [13] 王吉桥, 王声权, 程俊驰, 等. 沙塘鳢属鱼类的生物学[J]. 水产科学, 2005, 24(10): 32-34.
WANG J J, WANG S Q, CHENG J C, et al. Biology of dark sleeper (*Odontobutis* sp.) [J]. Fisheries Science, 2005, 24(10): 32-34.
- [14] HOESE D F, GILL A C. Phylogenetic relationships of eleotridid fishes (Perciformes: Gobioidae) [J]. Bulletin of Marine Science Miami, 1993, 52(1): 415-440.
- [15] IWATA A. Systematics of Odontobutidae [M]// PATZNER R, TASSELL JLV, KOVACIC M, et al. The biology of gobies. Enfield, USA: Science Publishers, 2011: 61-77.
- [16] FROESE R, PAULY D. Fish base [DB/OL]. [2018-12-18]. <https://www.fishbase.in/search.php>.
- [17] IWATA A, SAKAI H, SHIBUKAWA K, et al. Developmental characteristics of a freshwater goby, *Micropercops swinhonis*, from Korea [J]. Zoological Science, 2001, 18(1): 91-97.
- [18] 陈义雄, KOTTELAT M, 伍汉霖. A new genus of freshwater sleeper (Teleostei: Odontobutidae) from southern China and mainland southeast Asia [J]. 台湾水产学会刊, 2002, 29(3): 229-235.
CHEN I S, KOTTELAT M, WU H L. A new genus of freshwater sleeper (Teleostei: Odontobutidae) from southern China and mainland southeast Asia [J]. Journal of the Fisheries Society of Taiwan, 2002, 29(3): 229-235.
- [19] SPRINGER V G, JOHNSON G D. Study of the dorsal gill-arch musculature of teleostome fishes, with special reference to the Actinopterygii [J]. Copeia, 2006(2): 323-330.
- [20] IWATA A, JEON S R, MIZUNO N, et al. Larval development of a gobiid fish, *Odontobutis obscura* in comparison with that of *O. interrupta* and of *O. platycephala* [J]. Japanese Journal of Ichthyology, 1988, 35: 371-381.
- [21] NELSON J S. Fishes of the world [M]. 4th ed. New York:

John Wiley and Sons, Inc, 2006.

- [22] 伍汉霖, 钟俊生. 中国动物志硬骨鱼纲鲈形目(五) 虾虎鱼亚目[M]. 北京: 中国动物志, 2008.
- WU H L, ZHONG J S. Fauna Sinica Ostichthyes Perciformes (V) Gobioidi[M]. Beijing: Science Press, 2008.
- [23] AKIHITO, KOBAYASHI T, IKEO K, et al. Evolutionary aspects of gobioid fishes based upon a phylogenetic analysis of mitochondrial cytochrome b genes[J]. Gene, 2000, 259(1/2): 5-15.
- [24] THACKER C E, HARDMAN M A. Molecular phylogeny of basal gobioid fishes: Rhyacichthyidae, Odontobutidae, Xenisthmidae, Eleotridae (Teleostei; Perciformes; Gobioidi) [J]. Molecular Phylogenetics & Evolution, 2005, 37(3): 858-871.
- [25] THACKER CE, SATOH TP, KATAYAMA E, et al. Molecular phylogeny of percomorpha resolves trichonotus as the sister lineage to Gobioidi (Teleostei; Gobiiformes) and confirms the polyphyly of Trachinoidei[J]. Molecular Phylogenetics & Evolution, 2015, 93: 172-179.
- [26] JUN J, CHOI S H, KUM J D. Complete mitochondrial genome of the endemic south Korean species *Odontobutis interrupta* (Perciformes, Odontobutidae) [J]. Journal Mitochondrial DNA Part A DNA Mapping, Sequencing, and Analysis, 2016, 27(4): 2957-2959.
- [27] THOMPSON J D, GIBSON T J, PLEWNIAC F, et al. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25(25): 4876-4882.
- [28] KOICHIRO T, JOEL D, MASATOSHI N, et al. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0 [J]. Molecular Biology and Evolution, 2007, 24(8): 1596.
- [29] GAO F, GAO S, WANG P, et al. Phylogenetic analyses of cyclidiids (Protista, Ciliophora, Scuticociliatia) based on multiple genes suggest their close relationship with thigmotrichids [J]. Molecular Phylogenetics & Evolution, 2014, 75(6): 219-226.
- [30] MILLER M A, PFEIFFER W, SCHWARTZ T. Creating the CIPRES science gateway for inference of large phylogenetic trees[C]//IEEE Computer Society, 2010 Gateway computing environments workshop. New Orleans, LA, USA: IEEE, 2010: 1-8.
- [31] WANG P, GAO F, HUANG J, et al. A case study to estimate the applicability of secondary structures of SSU-rRNA gene in taxonomy and phylogenetic analyses of ciliates [J]. Zoologica Scripta, 2015, 44(5): 574-585.
- [32] RONQUIST F, HUELSENBECK J P. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models [J]. Bioinformatics, 2003, 19(12): 1572-1574.
- [33] 宋超, 吕杨, 赵峰, 等. 16S rRNA 和 COI 基因序列对长江口虾虎鱼科鱼类种类鉴定和系统分类的对比研究 [J]. 水产研究, 2016, 3(4): 71-81.
- SONG C, LÜ Y, ZHAO F, et al. Comparative study of mitochondrial 16S rRNA and COI gene sequences in species identification and phylogeny of Gobiidae from Yangtze estuary [J]. Open Journal of Fisheries Research, 2016, 3(4): 71-81.
- [34] 莫帮辉, 屈莉, 韩松等. DNA 条形码识别 I. DNA 条形码研究进展及应用前景 [J]. 四川动物, 2008, 27(2): 303-306.
- MO B H, QU L, HAN S, et al. DNA barcoding identification I. research progress and applied perspective of DNA barcoding [J]. Sichuan Journal of Zoology, 2008, 27(2): 303-306.
- [35] CHRISTOPHER P M, GUSTAV P. DNA barcoding error rates based on comprehensive sampling [J]. PLoS Biology, 2005, 3(12): e422.
- [36] VENCES M, THOMAS M, MEIJDEN A V, et al. Deciphering amphibian diversity through DNA barcoding chances and challenges [J]. Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences, 2005, 360(1462): 1859-1868.
- [37] JANZEN D H, HAJIBABAEI M, BURNS J M. Wedding biodiversity inventory of a large and complex lepidoptera fauna with DNA barcoding [J]. Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences, 2005, 360(1462): 1835-1845.
- [38] HEBERT P D N, RATNASINGHAM S, de WAARD J R. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species [J]. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 2003, 270(Suppl): 96-99.
- [39] SAUNDERS G W. Applying DNA barcoding to red macroalgae: a preliminary appraisal holds promise for future applications [J]. Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences, 2005, 360(1462): 1879-1888.
- [40] STOECKLE M Y, HEBERT P D N. Barcode of life [J]. Scientific American, 2008, 299(4): 82-88.
- [41] JOHNS G C, AVISE J C. A comparative summary of genetic distances in the vertebrates from the mitochondrial cytochrome b gene [J]. Molecular Biology & Evolution, 1998, 15(11): 1481-1490.