

基于线粒体COI和16S片段序列的北部湾北部水螅水母DNA条形码分析

张瑄妮³ 郑连明^{1,2,3*} 何劲儒³ 张文静^{1,3} 林元烧^{1,3} 李 阳³

1 (厦门大学海洋生物多样性与全球变化研究中心, 福建厦门 361102)

2 (福建省海陆界面生态环境重点实验室, 福建厦门 361102)

3 (厦门大学海洋与地球学院, 福建厦门 361102)

摘要: 水螅水母类是浮游动物群落的重要组成部分, 在近岸海洋生态系统物质循环和能量流动中扮演着重要角色。水螅水母类形态结构简单, 但其物种的准确鉴定一直是分类工作中的难点。DNA条形码极大地促进了水螅水母物种的快速、准确鉴定。本研究扩增了北部湾北部28种水螅水母的线粒体COI和16S序列, 分别为92条和116条; 比较了2个基因片段的种内、种间K2P (Kimura 2-parameter)遗传距离; 构建了基于这2个基因片段的系统发育邻接树(neighbor-joining phylogenetic tree); 并结合矢量分析构建了Klee-diagram图。结果显示: COI序列的种内遗传距离为 0.008 ± 0.005 (0–0.033), 种间遗传距离为 0.298 ± 0.128 (0.092–0.597); 16S序列的种内遗传距离为 0.006 ± 0.010 (0–0.047), 种间遗传距离为 0.394 ± 0.195 (0.068–0.898)。2个基因序列在所调查种类中, 种内遗传差异均小于种间遗传差异, 存在明显的条形码间隔(barcoding gap)。基于2个基因片段的NJ树均显示, 单种所有个体都位于同一独立分枝。研究表明, 以COI和16S作为DNA条形码均能对北部湾北部常见水螅水母类进行物种鉴定。

关键词: DNA条形码, 分子标记, 矢量分析, 物种鉴定, 水螅水母

DNA barcoding of hydromedusae in northern Beibu Gulf for species identification

Dangni Zhang³, Lianming Zheng^{1,2,3*}, Jinru He³, Wenjing Zhang^{1,3}, Yuanshao Lin^{1,3}, Yang Li³

1 Marine Biodiversity and Global Change Research Center, Xiamen University, Xiamen, Fujian 361102

2 Fujian Provincial Key Laboratory for Coastal Ecology and Environmental Studies (CEES), Xiamen University, Xiamen, Fujian 361102

3 College of Ocean and Earth Sciences, Xiamen University, Xiamen, Fujian 361102

Abstract: Being a major component of coastal zooplankton assemblages, hydromedusae play a key role in material recycling and energy flow of marine ecosystems. Species identification is challenging for this group due to their phonetic simplicity. DNA barcoding provides an efficient method for species identification. In the present study, 92 COI and 116 16S sequences from 28 hydromedusae species were amplified. A neighbor-joining phylogenetic tree was constructed based on Kimura 2-parameter genetic distance and further studied using Klee-diagram vector analysis. Intra-specific K2P genetic distance averaged 0.008 ± 0.005 (0–0.033) for COI, and 0.006 ± 0.010 (0–0.047) for 16S; inter-specific K2P genetic distance averaged 0.298 ± 0.128 (0.092–0.597), and 0.394 ± 0.195 (0.068–0.898) for COI and 16S, respectively. An obvious “barcoding gap” was detected for all species in both markers and all individuals of a species clustered together in both the COI and 16S trees. Further confirmatory evidence was also provided through indicator vector analysis. Hence, both COI and 16S appear to be accurate and efficient markers for hydromedusae identification in northern Beibu Gulf.

Key words: DNA barcoding, molecular marker, vector analysis, species identification, hydromedusae

收稿日期: 2014-05-09; 接受日期: 2014-11-19

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金(41006078)、海洋公益性行业专项(201005012-3, 201005015-5)、厦门大学中央高校基本科研业务费专项资金(2010121037)、厦门大学海洋科学基地科研训练及科研能力提高项目(J1210050)。

* 通讯作者 Author for correspondence. E-mail: zhlm@xmu.edu.cn

水螅水母类是刺胞动物门水母亚门水螅虫纲中具水母世代物种的统称(本研究包括管水母目), 其种类多、数量大, 是浮游动物的重要类群, 对近岸及海湾海洋生态系统结构与功能影响显著。近年来水母暴发已成为影响全球各大海洋生态系统健康的重大问题(Pitt *et al.*, 2009; Purcell, 2012; 程方平等, 2012), 因此, 加强对各海域水母类多样性变化趋势的研究势在必行。北部湾是我国高产量的渔场之一, 开展该海域水母类多样性研究是生态系统保护和渔业资源管理的共同需求。

水螅水母类的物种鉴定一直是分类学工作的难点, 主要的原因有: (1)水螅水母为数不多的具甄别性特点的形态性状易随发育阶段或生境的改变而产生较大变化, 因此, 常规形态学鉴定容易造成同种异名或异种同名等错误; (2)世代交替(有性世代水母型及无性世代水螅型)是多数水螅水母类生活史的显著特点, 由于缺乏对整个生活史统一的了解, 造成长期以来海洋水螅水母分类系统的隔离; (3)越来越多的研究表明, 海洋水螅水母类(尤其是世界广布种)存在隐存种(cryptic species), 形态多样性无法反映其真正的物种多样性(Lindner *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2013)。因此, 迫切需要开发新的物种鉴定方法。

DNA条形码技术的出现极大地方便了物种鉴定工作(Hebert *et al.*, 2003, 2004a)。在大多数动物类群中, 线粒体细胞色素C氧化酶第一亚基(COI)被广泛采纳为通用的标准条形码基因片段(Hebert *et al.*, 2004b; Ward *et al.*, 2005; Hajibabaei *et al.*, 2006; Ratnasingham *et al.*, 2007)。然而, 刺胞动物门的DNA条形码应采用什么分子标记, 目前仍然存在争议。研究表明, 多数珊瑚虫纲种类的COI和其他线粒体基因(如线粒体核糖体RNA大亚基基因, 16S)相比, 进化速率缓慢, 因此被认为不适合作为该类群DNA条形码标准基因(McFadden *et al.*, 2000; Shearer *et al.*, 2002; Hellberg *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2008; McFadden *et al.*, 2011)。然而, Sinniger等(2008)对六放珊瑚目、Stampar等(2012)对角海葵目的研究结果发现, COI和16S均可准确区分近缘种, 实现物种准确鉴定。而在水螅虫纲, Shearer等(2002)证实某些种类的COI突变速率较低, Huang等(2008)也提出应谨慎选择COI作为该类群DNA条形码序列; 而Govindarajan等(2006)则发现曲膝蕨枝螅

(*Obelia geniculata*)的COI碱基替换率较高, 并提出COI可有效地应用于水螅虫纲系统学研究。近年来, Ortman等(2010)和Bucklin等(2011)分别开展了水母亚门和海洋后生动物DNA条形码工作, 指出COI可以作为水母亚门种类的标准序列, 但前者的序列多来自管水母目的种类。

相比于COI, 16S序列较易扩增, 特别是在花水母目和软水母目种类中表现得更为明显(Shearer *et al.*, 2002; Miglietta *et al.*, 2009; Moura *et al.*, 2011b, 2012)。因此, 16S序列被广泛应用于水螅虫纲系统学研究, 其范围覆盖了从种群到科等各分类阶元(Collins *et al.*, 2008; Moura *et al.*, 2008; Leclère *et al.*, 2009; Bucklin *et al.*, 2011; Moura *et al.*, 2012)。同时, 它还常作为一种有效的分子标记, 用以区分形态差异细微、不可辨识或尚未描述的种类(Schuchert *et al.*, 2006; Miglietta *et al.*, 2009; Miranda *et al.*, 2010; Moura *et al.*, 2011a, b)。Schuchert等(2006, 2007, 2008a, b, 2009)更是将16S序列作为欧洲海域花水母目物种描述的补充要素。总的来说, 16S序列在水螅虫类系统学研究中的应用比COI更为普遍(Moura *et al.*, 2012)。

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隔(barcoding gap), 并可有效区分物种(Hebert *et al.*, 2004b; Meyer *et al.*, 2005; Köhler *et al.*, 2007)。本项目以北部湾北部常见水螅水母为研究对象, 同时扩增了其COI和16S序列, 比较了两个片段作为条形码标准基因的适用性和潜力, 并结合系统发育树构建和矢量分析法评估了这两个片段用于鉴别近海常见水螅水母类的应用前景。

1 材料与方法

1.1 样品采集、保存与鉴定

于北部湾北部海域共设置40个站位, 以浮游生物I型网(网孔505 μm)自底层至表层垂直拖取浮游动物样品(图1)。样品采集后首先挑选出性腺发育成熟、形态特征完整的水螅水母个体, 分别置于玻璃缸中, 以过滤海水静养24 h; 然后借助Zeiss SteREO V12解剖镜和Olympus BX51显微镜进行形态鉴定, 并采集图像; 最后将样品保存于95%乙醇中备用。

1.2 DNA提取及PCR扩增

取整个个体或其伞部组织, 以SDS-蛋白酶消

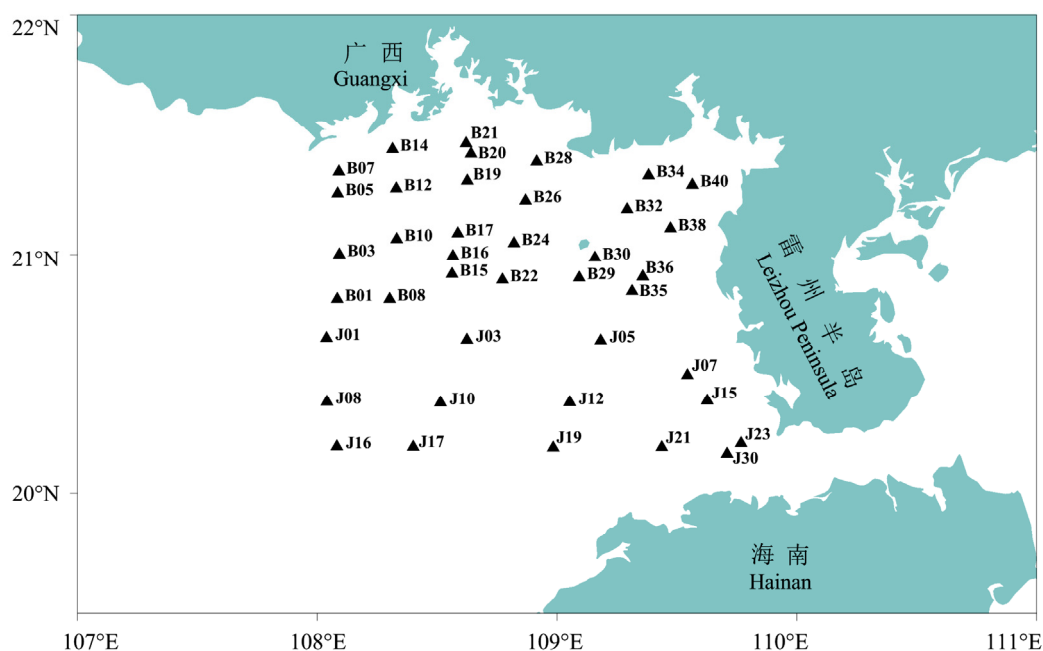


图1 北部湾北部水螅水母采样站位图。B: 近岸站位; J: 离岸站位

Fig. 1 Sampling sites in Northern Beibu Gulf for this study. B, Inshore sites; J, Offshore sites.

化、酚氯仿法提取其基因组DNA(Zheng *et al.*, 2009), 产物以TE缓冲溶液于-20℃保存。

以通用引物LCO-1490(5'-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G-3')和HCO-2198(5'-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AATCA-3')(Folmer *et al.*, 1994)扩增线粒体COI片段, 16S片段则以前人报道引物16S-L(5'-GAC TGT TTA CCA AAA ACA TA-3')和16S-H(5'-CAT AAT TCA ACA TCG AGG-3')(Ender *et al.*, 2003)扩增。所有PCR反应均采用Takara Ex Taq扩增酶, 配制25 μL体系, 在Bio-Rad S1000热循环仪中完成。COI反应程序为: 94℃预变性4 min, 然后33个循环(包括94℃变性40 s, 50℃退火1 min, 72℃延伸1 min 30 s), 最后72℃延伸5 min。16S反应程序为预处理5个循环, 包括: 94℃变性1 min, 45℃退火50 s, 72℃延伸1 min, 接着为30个循环(包括94℃变性50 s, 50℃退火1 min, 72℃延伸1 min), 最后72℃延伸5 min。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测, 纯化后送往上海生工生物工程技术有限公司, 在ABI 3730基因分析仪上测序。

1.3 数据处理

同一物种尽可能选取多个个体测序, 所获原始序列首先与其对应峰图对比检查, 以确认序列质量; 然后用ClustalX V2软件分别进行序列多重比对

(Larkin *et al.*, 2007), 采用EditSeq V7.1辅助校对, 并检查碱基插入和缺失; 最后在NCBI数据库中进行BLAST比对分析, 确定序列准确性, 并登录序列至GenBank数据库, 应用MEGA V5软件, 首先以Kimura 2-Parameter (K2P) (Kimura *et al.*, 1980)模型分别计算2个片段各自的序列差异(Tamura *et al.*, 2011); 然后按设定分类组别分别统计K2P遗传距离的变化幅度; 最后结合GenBank中报道的相关序列, 分别构建系统发育邻接树(neighbor-joining tree, K2P模型)和最大相似树(maximum-likelihood tree, GTR+G+I模型)。系统发育树各节点支持度计算采用bootstrap方法, 各设1,000次重复, 并选取2种钵水母即海月水母(*Aurelia aurita*)和棕缘海月水母(*A. limbata*), 1种十字水母(*Craterolophus convolvulus*)和1种珊瑚虫(*Siderastrea radians*)等4条序列作为外群。此外, 本研究参照Sirovich等(2009, 2010)的矢量分析方法, 构建北部湾常见水螅水母条形码Klee-diagram图。

2 结果

在北部湾北部海域共采集水螅水母类2亚纲5目13科19属28种共116个个体, 测得COI和16S序列共208条, 其中COI片段13科18属26种92条, 16S片

表 1 各分类阶元遗传距离统计
Table 1 Genetic distance on different taxonomic levels

分类组别 Taxonomy group	COI					16S				
	计数值 N	最小值 Min	最大值 Max	平均值 Mean	标准差 S.D.	计数值 N	最小值 Min	最大值 Max	平均值 Mean	标准差 S.D.
种内遗传距离 Intra-species	194	0.000	0.033	0.008	0.005	320	0.000	0.047	0.006	0.010
种间遗传距离 Inter-species	3,992	0.092	0.597	0.298	0.128	6,350	0.068	0.898	0.394	0.195
各属遗传距离 Intra-genus	370	0.092	0.215	0.171	0.032	316	0.068	0.225	0.157	0.044
多管水母属 <i>Aequorea</i>	41	0.126	0.160	0.148	0.016	75	0.085	0.127	0.109	0.014
和平水母属 <i>Eirene</i>	323	0.092	0.215	0.173	0.032	220	0.068	0.225	0.174	0.036
真瘤水母属 <i>Eutima</i>	6	0.203	0.212	0.208	0.003	15	0.184	0.189	0.187	0.002
玛拉水母属 <i>Malagazzia</i>	—	—	—	—	—	6	0.069	0.069	0.069	0.000
各科遗传距离 Intra-family	230	0.127	0.351	0.189	0.037	473	0.111	0.386	0.258	0.091
多管水母科 Aequoreidae	12	0.127	0.159	0.145	0.010	16	0.111	0.125	0.117	0.005
双生水母科 Diphyidae	9	0.347	0.351	0.349	0.002	169	0.360	0.386	0.373	0.007
和平水母科 Eirenidae	206	0.155	0.233	0.185	0.017	277	0.114	0.261	0.200	0.035
触丝水母科 Lovenellidae	—	—	—	—	—	6	0.202	0.205	0.203	0.001
玛拉水母科 Malagazziidae	3	0.175	0.177	0.175	0.001	5	0.121	0.132	0.128	0.006
各目遗传距离 Intra-order	940	0.105	0.566	0.199	0.075	1,847	0.086	0.775	0.211	0.096
花水母目 Anthoathecata	12	0.178	0.211	0.204	0.009	35	0.222	0.289	0.260	0.017
软水母目 Leptothecata	878	0.105	0.566	0.185	0.046	1,747	0.086	0.327	0.194	0.032
管水母目 Siphonophorae	50	0.446	0.499	0.483	0.014	65	0.366	0.775	0.659	0.148
各亚纲遗传距离 Intra-subclass	1,425	0.150	0.596	0.349	0.143	3,160	0.185	0.756	0.486	0.144
软水母亚纲 Hydroidolina	1,395	0.150	0.596	0.348	0.144	3,154	0.185	0.672	0.486	0.144
硬水母亚纲 Trachylinae	30	0.407	0.418	0.413	0.004	6	0.728	0.756	0.741	0.010
水螅虫纲遗传距离 Intra-class (Hydrozoa)	1,027	0.207	0.597	0.371	0.076	554	0.295	0.898	0.570	0.170

段13科19属28种116条。物种名称、样品编号及 GenBank 序列登录号见附表1。

2.1 遗传差异

本研究以K2P模型计算出序列间遗传距离，并按照分类阶元进行统计分析(表1)。结果显示，COI 的种内遗传距离为0–0.033(平均值为0.008)，其中 94%的种内遗传距离小于0.020(图2)；锥形多管水母(*Aequorea conica*)出现种内遗传距离的最大值(0.033)。COI种间遗传距离为0.092–0.597(平均值为0.298)，和平水母属的锡兰和平水母(*Eirene ceylonensis*)与细颈和平水母(*Eirene menoni*)间遗传距离最小(0.092)。

16S 的种内遗传距离为 0–0.047(平均值为 0.006)，其中93%的种内遗传距离小于0.020(图2)。拟细浅室水母(*Lensia subtiloides*)的种内遗传距离最大(0.047)。种间遗传距离为0.068–0.898(平均值为0.394)；和平水母属的锡兰和平水母与细颈和平水母间遗传距离最小(0.068)。

COI 同属不同种间 K2P 遗传距离为 0.092–0.215(平均值为0.171)，而同科不同属间遗传距离为

0.127–0.351(平均值为0.189)。其中，锡兰和平水母与细颈和平水母间遗传距离最小，为0.092，短柄和平水母(*Eirene brevistylus*)与蟹形和平水母(*Eirene kambara*)间遗传距离最大，为0.215。对于16S，其同属不同种间K2P遗传距离为0.068–0.225(平均值为0.157)，而同科不同属间遗传距离为0.111–0.386(平均值为0.258)。其中，锡兰和平水母与细颈和平水母间同样表现出最小的遗传距离，为0.068；短柄和平水母和六辐和平水母(*Eirene hexanemali*)间遗传距离最大，为0.225。2个基因序列在所调查种类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隔(barcoding gap)(图2)。

此外，结果显示，同属不同种个体间的COI变异速率约是同种个体间的30倍，同科不同属个体间的变异速率仅略大于同属个体间。对于16S，同属不同种个体间变异速率约为同种个体间的60倍，同科不同属个体间的变异速率显著高于同属个体间。

2.2 基于系统发育树的物种鉴定

基于COI和16S的系统发育邻接树中，所有同种序列都能形成具有较高支持度的单分枝，证明两

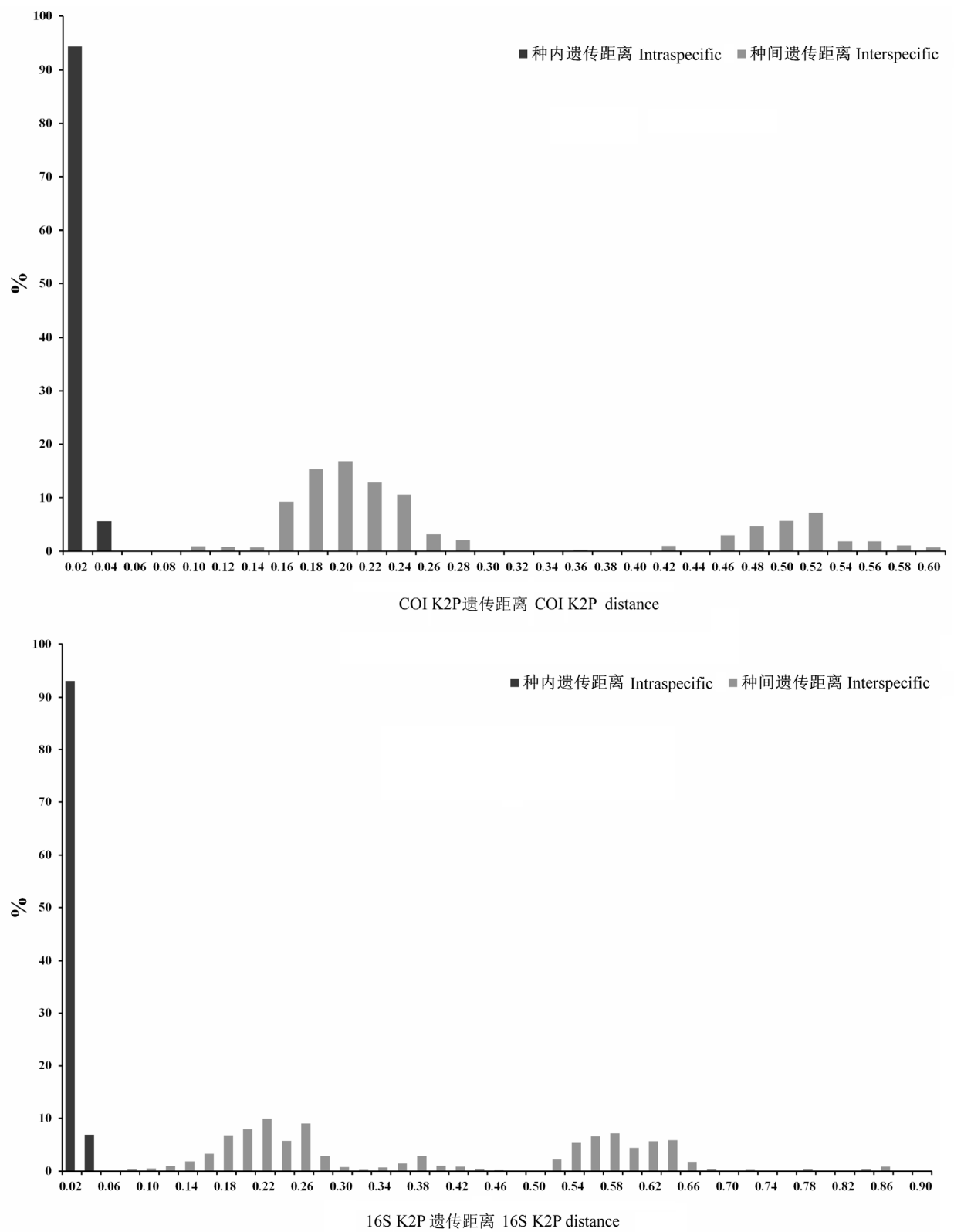


图2 COI、16S种内种间遗传差异(K2P遗传距离)分布图

Fig. 2 Distribution of the intraspecific and interspecific genetic variabilities (Kimura-2-parameter distance) of COI and 16S

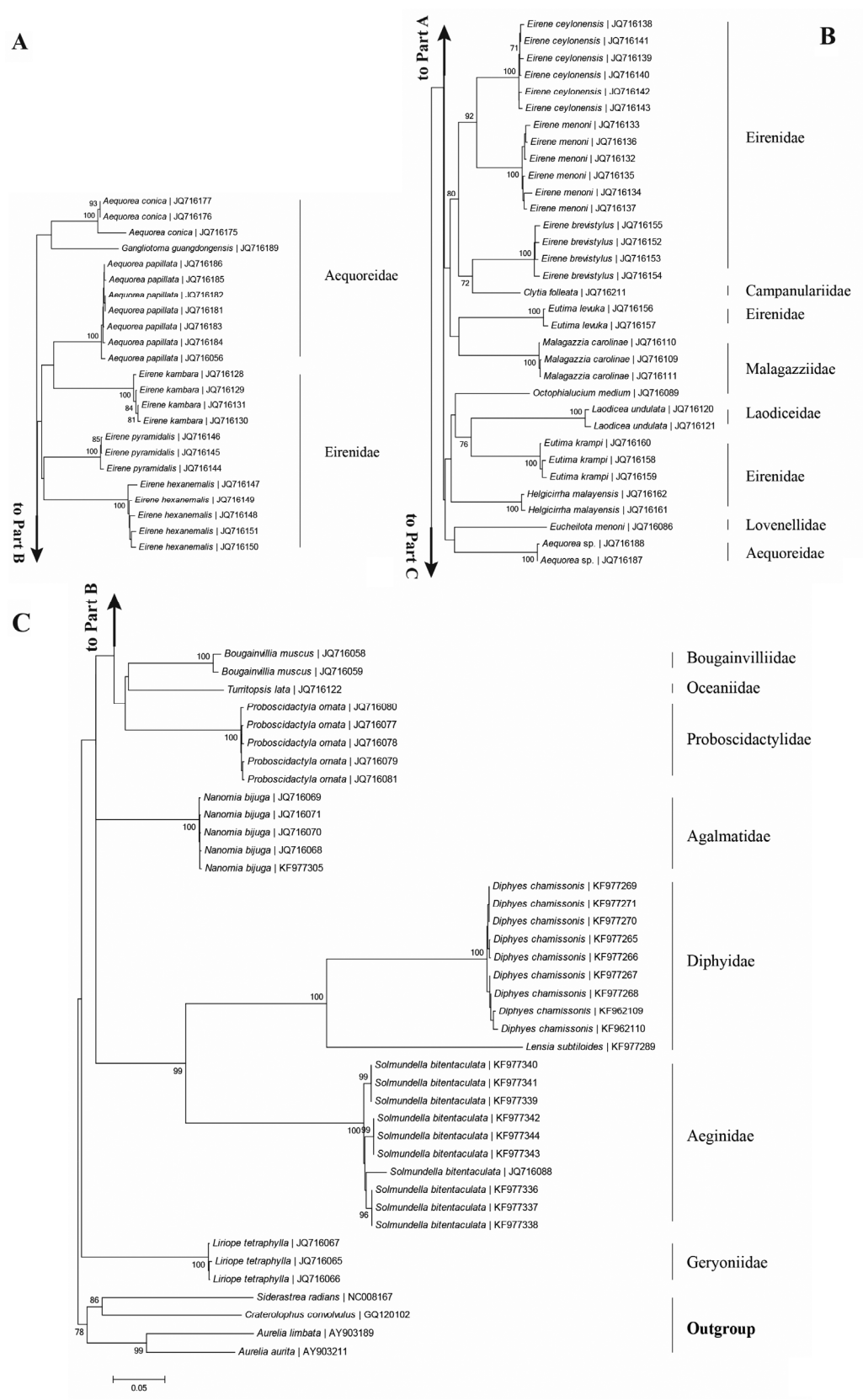


图3 基于COI序列的邻接(NJ)树(图中标注各科)

Fig. 3 Neighbor-joining (NJ) clustering based on COI sequences. Families are noted in the figure.

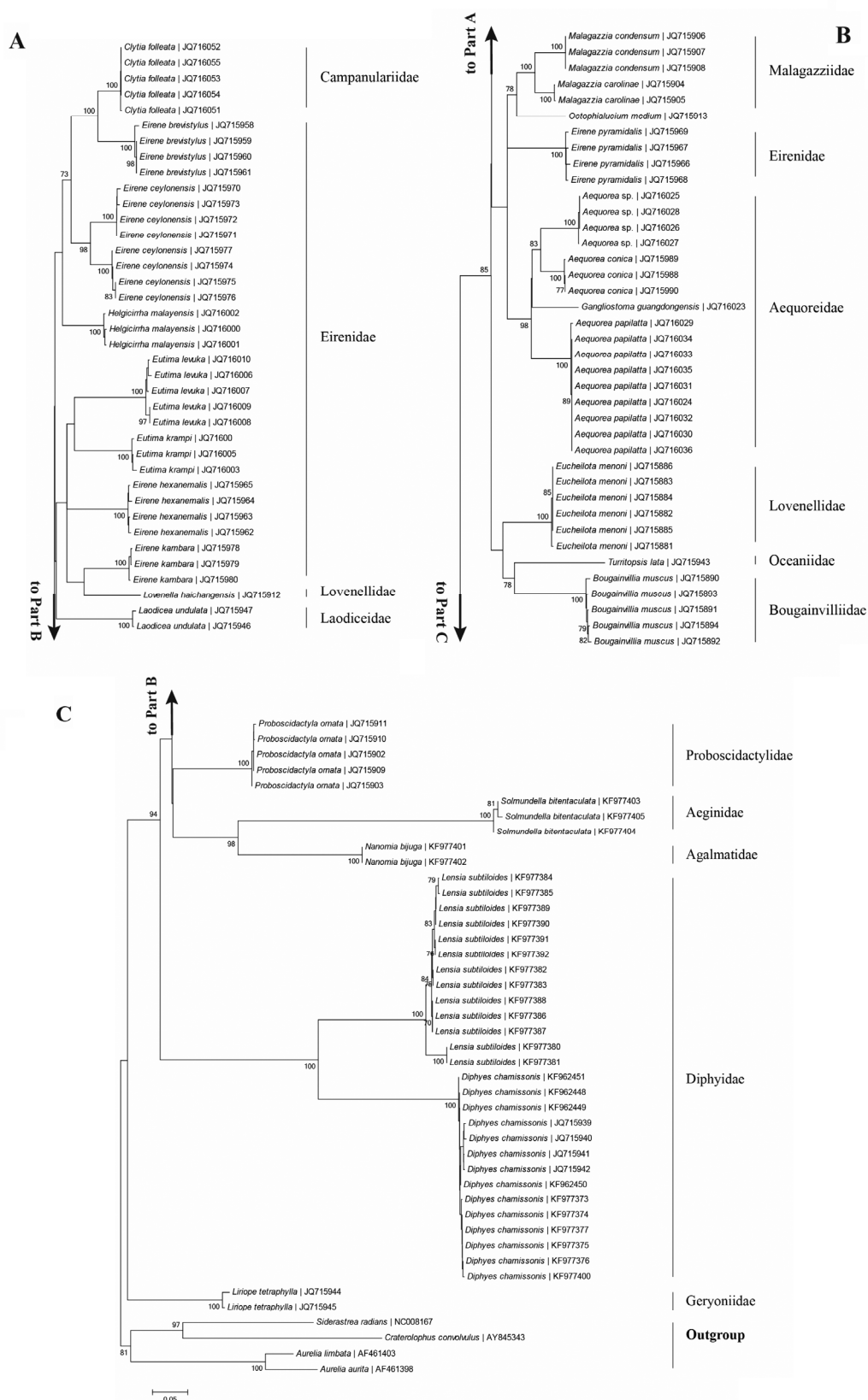


图4 基于16S序列的邻接(NJ)树(图中标注各科)

Fig. 4 Neighbor-joining (NJ) clustering based on 16S sequences. Families are noted in the figure.

个片段均能很好地区分物种(图3, 图4)。在更高分类阶元, COI成功解析出软水母目、花水母目和硬水母目的单系性(图3); 而16S在真瘤水母属(*Eutima*)、多管水母科、玛拉水母科、双生水母科和硬水母目均表现为单系性(图4)。

2.3 基于Klee-diagram的类群分析

基于北部湾北部常见水螅水母的矢量分析发现, COI和16S均显示出明显的种内序列比对“热区”, 即同种序列的相似程度明显高于种间序列, 直观显示出种内、种间遗传距离差异; 同时, 2个片段的管水母目序列均表现为独立的“热区”, 显示出其与软水母目、花水母目序列的明显差别, 这与NJ树分析的结果一致(附图1)。

3 讨论

一般情况下, 同种个体间的遗传差异会小于近缘物种之间的差异(Del-Prado *et al.*, 2010), 即种内、种间遗传差异的幅度确定了物种的界限(Köhler *et al.*, 2007)。若种内、种间遗传差异存在重叠, 则说明该分子标记无法准确区分物种。理论上, 有效的DNA条形码应存在条形码间隔, 即种内、种间遗传距离差异明显。Hebert等(2003)提出, 种间遗传差异应达到种内遗传差异的10倍。现有研究证实, 水螅虫纲多个类群的COI种内、种间遗传距离并不重叠(Zemlak *et al.*, 2009; Ortman *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2012)。而本研究所涉及种类的COI和16S序列均有明显条形码间隔, 2个片段同属种间的遗传距离均比种内遗传距离高出30倍, 证实了它们作为该海域水螅虫纲生物DNA条形码标准基因的可行性。

DNA条形码的广泛应用, 为分类学的发展注入了强大动力(Hebert *et al.*, 2005)。DNA条形码有望成为水螅虫类物种鉴定的必要补充, 但其标准基因的选取则因数据缺乏而未能达成共识(Pontin *et al.*, 2012)。理论上, 基于条形码片段遗传距离的拓扑结构中, 同种的所有个体应聚集且形成一个独立的单系分枝(Ortman *et al.*, 2010)。在本研究中, COI和16S均存在着明显的条形码间隔, 同种个体均能形成单系群, 并有较高的支持度, 这证实了其作为DNA条形码片段甄别物种的有效性。

随着研究的深入, DNA条形码的应用已不局限于物种层次的区分, 在隐存种鉴定中也助力颇多, 这就要求作为条形码的基因片段具有较快的进化

速率, 以有效划分物种范围。在水螅虫纲, 以COI为标记研究物种的变异范围已有报道(Huang *et al.*, 2008; Ortman *et al.*, 2010; Pontin *et al.*, 2012)。值得注意的是, 程方平等(2012)对中国北方海域习见水母类DNA条形码分析, Zhou等(2013)在中国东海美水母的新种发现及Laakmann和Holst(2013)在大西洋北海水螅水母鉴定等工作中均证实了COI在疑难种类鉴定中的作用。本研究也证实了其较大的属内种间差异(0.092–0.215) (表1)。而对于16S, 同属种间差异与COI近似(0.068–0.225), 其属内核苷酸变异率与COI相比也较为接近(表1), 证明16S具备与COI相当的物种区分能力。实际上, 16S为标记的物种区分和隐存种甄别工作也已经取得了不错的成果(Govindarajan *et al.*, 2005; Schuchert *et al.*, 2005; 许振祖, 2008; 黄加祺, 2010; 李尚平, 2010)。我们注意到, 本研究所采集的北部湾四叶小舌水母与GenBank中来自加利福尼亚(美国)、加勒比海(巴拿马)等样品的16S序列有着较大的K2P遗传距离(0.087–0.119), 我们认为有必要对这一世界广布种的系统地理学作进一步研究。

本研究针对北部湾北部海域常见水螅水母类, 基于K2P遗传距离和NJ树的方法证明了COI和16S均可有效运用于其DNA条形码研究, 这一结果可促进该海域水螅水母类的生物多样性研究。自Sirovich等(2009, 2010)引入矢量分析, 将未知序列划归到确定的种、属等动物类群之后, Klee-diagram有效地促进了DNA条形码的应用。Bucklin (2011)等报道了软骨鱼类中主要类群的高度相似性使得类群鉴别得以实现, 并以鳐类为例, 证实了矢量分析对于科、属水平的“放大功能”(zoom function)。Cheng等(2013)则通过对南极海域浮游动物的矢量分析, 发现了桡足类、枝角类、磷虾和端足类等类群各自的高度相似性, 以及软体动物、多毛类之间的显著差异。本研究中, 对于COI序列, 和平水母属序列相似性较高; 对于16S序列, 多管水母属、和平水母属、玛拉水母属也有着相对较高的相似性。相比之下, 16S序列总体相似性高于COI序列。

可以预测, 基于矢量分析的类群划分在北部湾北部海域水螅水母, 甚至浮游动物的多样性研究中将发挥更大的作用。但是, 由于本研究采样范围局限, 未能在更广泛的地理范围内讨论物种的遗传差异和隐种分化。未来随着物种数和样品量的增加,

可进一步探讨两个基因片段在水螅虫纲系统发育研究中的应用潜力。

致谢: 本研究物种鉴定工作得到厦门大学许振祖教授和黄加祺教授的悉心指导, 在此表示诚挚谢意! 厦门大学仪器与技术开放共享平台为实验进行提供了必要的仪器设备和技术支持, 在此一并致谢!

参考文献

- Bucklin A, Steinke D, Blanco-Bercial L (2011) DNA barcoding of marine metazoa. *Annual Review of Marine Science*, **3**, 471–508.
- Cheng FP (程方平), Wang MX (王敏晓), Wang YT (王彦涛), Zhang F (张芳), Li CL (李超伦), Sun S (孙松) (2012) DNA barcoding of common medusozoa in northern China based on mtCOI sequence. *Oceanologia et Limnologia Sinica* (海洋与湖沼), **43**, 451–459. (in Chinese with English abstract)
- Cheng F, Wang M, Sun S, Li C, Zhang Y (2013) DNA barcoding of Antarctic marine zooplankton for species identification and recognition. *Advances in Polar Science*, **24**, 119–127.
- Collins AG, Bentlage B, Lindner A, Lindsay D, Haddocka SHD, Jarmsa G, Norenburga JL, Jankowskia T, Cartwrighta P (2008) Phylogenetics of Trachylina (Cnidaria: Hydrozoa) with new insights on the evolution of some problematic taxa. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **88**, 1673–1685.
- Del-Prado R, Cubas P, Lumbsch HT, Divakar PK, Blanco O, de Paz GA, Molina MC, Crespo A (2010) Genetic distances within and among species in monophyletic lineages of Parmeliaceae (Ascomycota) as a tool for taxon delimitation. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **56**, 125–133.
- Ender A, Schierwater B (2003) Placozoa are not derived cnidarians: evidence from molecular morphology. *Molecular Biology and Evolution*, **20**, 130–134.
- Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome C oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, **3**, 294–299.
- Govindarajan AF, Boero F, Halanach KM (2006) Phylogenetic analysis with multiple markers indicates repeated loss of the adult medusa stage in Campanulariidae (Hydrozoa, Cnidaria). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **38**, 820–834.
- Govindarajan AF, Halanach KM, Cunningham CW (2005) Mitochondrial evolution and phylogeography in the hydrozoan *Obelia geniculata* (Cnidaria). *Marine Biology*, **146**, 213–222.
- Hajibabaei M, Janzen DH, Burns JM, Hallwachs W, Hebert PDN (2006) DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **103**, 968–971.
- Hebert PDN, Gregory TR (2005) The promise of DNA barcoding for taxonomy. *Systematic Biology*, **54**, 852–859.
- Hebert PDN, Penton EH, Burns JM, Janzen DH, Hallwachs W, Affiliations A (2004a) Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **101**, 14812–14817.
- Hebert PDN, Ratnasingham S, Waard JR (2003) Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit I divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*, **270**, S96–S99.
- Hebert PDN, Stoeckle MY, Zemlak TS, Francis CM (2004b) Identification of birds through DNA barcodes. *PLoS Biology*, **2**, 1657–1663.
- Hellberg ME (2006) No variation and low synonymous substitution rates in coral mtDNA despite high nuclear variation. *BMC Evolutionary Biology*, **6**, 1–8.
- Huang D, Meier R, Todd PA, Chou LM (2008) Slow mitochondrial COI sequence evolution at the base of the metazoan tree and its implications for DNA barcoding. *Journal of Molecular Evolution*, **66**, 167–174.
- Huang JQ (黄加祺), Li SP (李尚平), Zhong QP (钟秋平), Zhang CX (张晨晓), Zhang YJ (张艳军) (2010) One new species of genus *Eucheilota* in Guangxi Coast, China. *Journal of Xiamen University (Natural Science)* (厦门大学学报自然科学版), **49**, 428–430. (in Chinese with English abstract)
- Jennifer EP (2012) Jellyfish and ctenophore blooms coincide with human proliferations and environmental perturbations. *Annual Review of Marine Science*, **4**, 209–235.
- Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, **16**, 111–120.
- Köhler F (2007) From DNA taxonomy to barcoding: how a vague idea evolved into a biosystematic tool. *Mitteilungen aus dem Museum für Naturkunde Berlin Zoologische Reihe*, **83**, 44–51.
- Laakmann S, Holst S (2013) Emphasizing the diversity of North Sea hydromedusae by combined morphological and molecular methods. *Journal of Plankton Research*, **36**, 64–76.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG (2007) Clustal W and clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, **23**, 2947–2948.
- Leclère L, Schuchert P, Cruaud C, Couloux A, Manuel M (2009) Molecular phylogenetics of Thecata (Hydrozoa, Cnidaria) reveals long-term maintenance of life history traits despite high frequency of recent character changes. *Systematic Biology*, **58**, 509–526.
- Li SP (李尚平), Zhong QP (钟秋平), Zhang CX (张晨晓), Huang JQ (黄加祺), Zhang YJ (张艳军) (2010) Two new

- species of the genus *Hydractinia* in Guangxi Coast, China (Cnidaria, Anthomedusae, Hydractiniidae). *Acta Zootaxonomica Sinica* (动物分类学报), **35**, 853–856. (in Chinese with English abstract)
- McFadden CS, Benayahu Y, Pante E, Thoma JN, Nevarez PA, France SC (2011) Limitations of mitochondrial gene barcoding in Octocorallia. *Molecular Ecology Resources*, **11**, 19–31.
- McFadden CS, Tullis I, Hutchinson MB, Winner K (2000) Rates of evolution of cnidarian mitochondrial genes. *American Zoologist*, **40**, 1124.
- Meyer CP, Paulay G (2005) DNA barcoding: error rates based on comprehensive sampling. *PLoS Biology*, **3**, 2229–2238.
- Miglietta MP, Schuchert P, Cunningham CW (2009) Reconciling genealogical and morphological species in a worldwide study of the family Hydractiniidae (Cnidaria, Hydrozoa). *Zoologica Scripta*, **38**, 403–430.
- Miranda LS, Collins AG, Marques AC (2010) Molecules clarify a Cnidarian life cycle—the “Hydrozoan” *Microhydrula limopiscicola* is an early life stage of the Staurozoan *Haliclystus antarcticus*. *PLoS ONE*, **5**, e10182.
- Moura CJ, Cunha MR, Porteiro FM, Rogers AD (2011a) Polyphyly and cryptic diversity in the hydrozoan families Lafoeidae and Hebellidae (Cnidaria: Hydrozoa). *Invertebrate Systematics*, **25**, 454–470.
- Moura CJ, Cunha MR, Porteiro FM, Rogers AD (2011b) The use of the DNA barcode gene 16S mRNA for the clarification of taxonomic problems within the family Sertulariidae (Cnidaria, Hydrozoa). *Zoologica Scripta*, **40**, 520–537.
- Moura CJ, Cunha MR, Porteiro FM, Rogers AD (2012) A molecular phylogenetic appraisal of the systematics of the Aglaopheniidae (Cnidaria: Hydrozoa, Leptothecata) from the north-east Atlantic and west Mediterranean. *Zoological Journal of the Linnean Society*, **164**, 717–727.
- Moura CJ, Harris DJ, Cunha MR, Rogers AD (2008) DNA barcoding reveals cryptic diversity in marine hydroids (Cnidaria, Hydrozoa) from coastal and deep-sea environments. *Zoologica Scripta*, **37**, 93–108.
- Ortman BD, Bucklin A, Pagès F, Youngbluth M (2010) DNA barcoding the Medusozoa using mtCOI. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, **57**, 2148–2156.
- Pitt KA, Welsh DT, Condon RH (2009) Influence of jellyfish blooms on carbon, nitrogen and phosphorus cycling and plankton production. *Hydrobiologia*, **616**, 133–149.
- Pontin DR, Cruickshank RH (2012) Molecular phylogenetics of the genus *Physalia* (Cnidaria: Siphonophora) in New Zealand coastal waters reveals cryptic diversity. *Hydrobiologia*, **686**, 91–105.
- Ratnasingham S, Hebert PDN (2007) BOLD: the barcode of life data system (<http://www.barcodinglife.org>). *Molecular Ecology Notes*, **7**, 355–364.
- Schuchert P (2005) Species boundaries in the hydrozoan genus *Coryne*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **36**, 194–199.
- Schuchert P (2006) The European athecate hydroids and their medusae (Hydrozoa, Cnidaria): Capitata Part 1. *Revue Suisse de Zoologie*, **113**, 325–410.
- Schuchert P (2007) The European athecate hydroids and their medusae (Hydrozoa, Cnidaria): Filifera Part 2. *Revue Suisse de Zoologie*, **114**, 195–396.
- Schuchert P (2008a) The European athecate hydroids and their medusae (Hydrozoa, Cnidaria): Filifera Part 3. *Revue Suisse de Zoologie*, **115**, 221–302.
- Schuchert P (2008b) The European athecate hydroids and their medusae (Hydrozoa, Cnidaria): Filifera Part 4. *Revue Suisse de Zoologie*, **115**, 677–757.
- Schuchert P (2009) The European athecate hydroids and their medusae (Hydrozoa, Cnidaria): Filifera Part 5. *Revue Suisse de Zoologie*, **116**, 441–507.
- Schuchert P, Reiswig HM (2006) *Brinckmannia hexactinellidophila*, n. gen., n. sp.: a hydroid living in tissues of glass sponges of the reefs, fjords, and seamounts of Pacific Canada and Alaska. *Canadian Journal of Zoology*, **84**, 564–572.
- Shearer TL, van Oppen MJH, Romano SL, Wörheide G (2002) Slow mitochondrial DNA sequence evolution in the Anthozoa (Cnidaria). *Molecular Ecology*, **11**, 2475–2487.
- Sinniger F, Reimer JD, Pawlowski J (2008) Potential of DNA sequences to identify zoanthids (Cnidaria: Zoantharia). *Zoological Science*, **25**, 1253–1260.
- Sirovich L, Stoeckle MY, Zhang Y (2009) A scalable method for analysis and display of DNA sequences. *PLoS ONE*, **4**, e7051.
- Sirovich L, Stoeckle MY, Zhang Y (2010) Structural analysis of biodiversity. *PLoS ONE*, **5**, e9266.
- Stampar SN, Maronna MM, Vermeij MJA, Silveira FLD, Morandini AC (2012) Evolutionary diversification of banded tube-dwelling anemones (Cnidaria; Ceriantharia; Isarachnanthus) in the Atlantic Ocean. *PLoS ONE*, **7**, e41091.
- Sun Y, Li Q, Kong L, Zheng X (2012) DNA barcoding of Caenogastropoda along coast of China based on the COI gene. *Molecular Ecology Resources*, **12**, 209–218.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, **28**, 2731–2739.
- Ward RD, Zemlak TS, Innes BH, Last PR, Hebert PDN (2005) DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences*, **360**, 1847–1857.
- Xu ZZ (许振祖), Huang JQ (黄加祺), Guo DH (郭东晖) (2008) Six new species of Anthomedusae (Hydrozoa, Hydroidomedusae) from the Beibu Gulf, China. In: *Symposium on Oceanography of Beibu Gulf I* (北部湾海洋科学研究论文集(第1辑)) (eds Hu JY (胡建宇), Yang SY (杨圣云)), pp. 209–221. China Ocean Press, Beijing. (in Chinese)
- Zemlak TS, Ward RD, Connell AD, Holmes BH, Hebert PD (2009) DNA barcoding reveals overlooked marine fishes.

- Molecular Ecology Resources*, **9**, 237–242.
- Zheng LM, Lin YS, Li SJ, Cao WQ, Xu ZZ, Huang JQ (2009) *Aequorea taiwanensis* n. sp. (Hydrozoa, Leptomedusae) and mtCOI sequence analysis for the genus *Aequorea*. *Acta Oceanologica Sinica*, **28**, 109–115.
- Zhou KL, Zheng LM, He JR, Lin YS, Cao WQ, Zhang WJ (2013) Detection of a new *Clytia* species (Cnidaria: Hydrozoa: Campanulariidae) with DNA barcoding and life cycle analyses. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **93**, 2075–2088.

(责任编辑: 葛学军 责任编辑: 时意专)

附录 Supplementary Material

附表1 物种信息、COI及16S序列GenBank登录号

Table S1 Species taxonomy, COI and 16S GenBank accession number

<http://www.biodiversity-science.net/fileup/PDF/w2014-089-1.pdf>

附图1 基于COI和16S的矢量分析图(横纵坐标均为序列编号, 白色虚线框分别为花水母、软水母亚纲和管水母亚纲序列所在区域, 彩色图例自冷色至暖色表示序列相似性增加)

Fig. S1 Vector analyses based on COI and 16S sequences. Left and bottom axis are sequence numbers. White dash line box indicate sequences of Anthomedusae and Leptomedusae, Siphonophorae, respectively. Cold to warm color bars indicate the increase of sequence similarity.

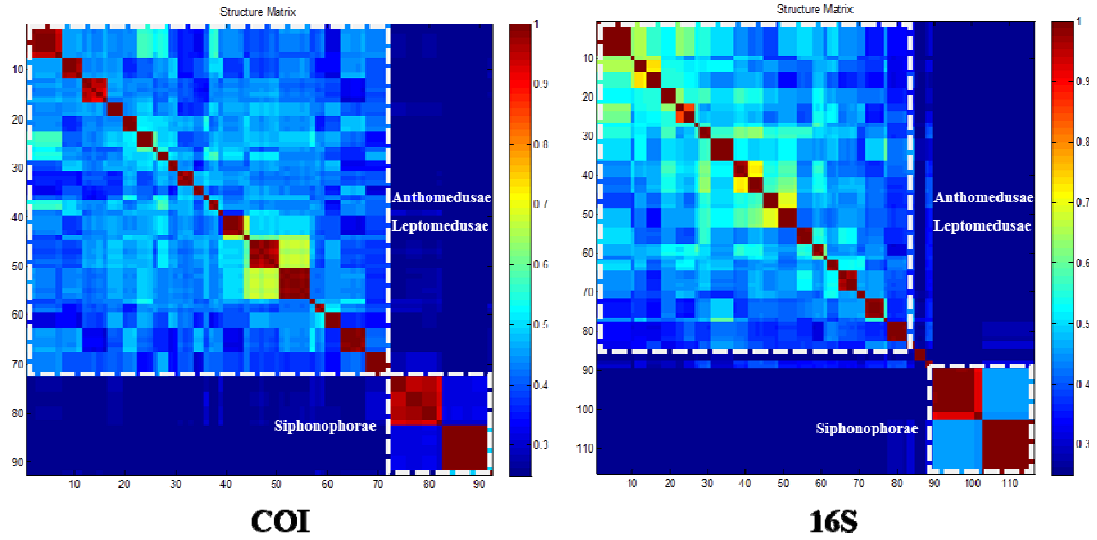
<http://www.biodiversity-science.net/fileup/PDF/w2014-089-2.pdf>

张瑛妮,郑连明,何劲儒,张文静,林元烧,李阳. 基于线粒体 COI 和 16S 片段序列的北部湾北部水螅水母 DNA 条形码分析. 生物多样性, 2015, 23(1): 50-60. <http://www.biodiversity-science.net/CN/article/downloadArticleFile.do?attachType=PDF&id=9969>

附表1 物种信息、COI及16S序列GenBank登录号

Table S1 Species taxonomy, COI and 16S GenBank accession numbers

物种 Species	COI	16S
软水母亚纲 Hydroidolina		
花水母目 Anthoathecata		
高手水母科 Bougainvilliidae		
鳞茎高手水母 <i>Bougainvillia muscus</i>	JQ716058, JQ716059	JQ715890-94
棒螅水母科 Oceaniidae		
短柄灯塔水母 <i>Turritopsis lata</i>	JQ716122	JQ715943
枝管水母科 Proboscoidactylidae		
芽口枝管水母 <i>Proboscoidactyla ornata</i>	JQ716077-81	JQ715902, JQ715903, JQ715909-11
软水母目 Leptothecata		
多管水母科 Aequoreidae		
锥形多管水母 <i>Aequorea conica</i>	JQ716175-77	JQ715988-JQ715990
乳突多管水母 <i>Aequorea papillata</i>	JQ716056, JQ716181-86	JQ716024, JQ716029-36
多管水母 <i>Aequorea</i> sp.	JQ716187, JQ716188	JQ716025-JQ716028
广东胃瘤水母 <i>Gangliostoma guangdongensis</i>	JQ716189	JQ716023
钟螅水母科 Campanulariidae	JQ716211	JQ716051-55
单囊美螅水母 <i>Clytia folleata</i>		
和平水母科 Eirenidae		
短柄和平水母 <i>Eirene brevistylus</i>	JQ716152-55	JQ715958-61
锡兰和平水母 <i>Eirene ceylonensis</i>	JQ716138-43	JQ715970-73
六辐和平水母 <i>Eirene hexanemalis</i>	JQ716147-51	JQ715962-65
蟹形和平水母 <i>Eirene kambara</i>	JQ716128-31	JQ715978-80
细颈和平水母 <i>Eirene menoni</i>	JQ716132-37	JQ715974-77
塔形和平水母 <i>Eirene pyramidalis</i>	JQ716144-46	JQ715966-69
黑球真瘤水母 <i>Eutima krampi</i>	JQ716158-60	JQ716003-05
真瘤水母 <i>Eutima levuka</i>	JQ716156, JQ716157	JQ716006-10
马来侧丝水母 <i>Helgicirra malayensis</i>	JQ716161, JQ716162	JQ716000-02
感棒水母科 Laodiceidae		
波状感棒水母 <i>Laodicea undulate</i>	JQ716120, JQ716121	JQ715946, JQ715947
触丝水母科 Lovenellidae		
黑球真唇水母 <i>Eucheilota menoni</i>	JQ716086	JQ715881-86
海沧触丝水母 <i>Lovenella haichangensis</i>	-	JQ715912
玛拉水母科 Malagazziidae		
卡玛拉水母 <i>Malagazzia carolinae</i>	JQ716109-11	JQ715904, JQ715905
厚伞玛拉水母 <i>Malagazzia condensum</i>	-	JQ715906-08
中型八拟杯水母 <i>Octophialucium medium</i>	JQ716089	JQ715913
管水母目 Siphonophorae		
盛装水母科 Agalmatidae		
细小水母 <i>Nanomia bijuga</i>	JQ716068-71, KF977305	KF977400-02
双生水母科 Diphyidae		
双生水母 <i>Diphyes chamissonis</i>	KF962109-10, KF977265-71	JQ715939-42, KF962448-51, KF977266-71
拟细浅室水母 <i>Lensia subtiloides</i>	KF977289	KF977380-92
硬水母亚纲 Trachylinae		
筐水母目 Narcomedusae		
间囊水母科 Aeginidae		
两手筐水母 <i>Solmundella bitentaculata</i>	JQ716088, KF977336-44	KF977403-05
硬水母目 Trachylina		
怪水母科 Geryoniidae		
四叶小舌水母 <i>Liriope tetraphylla</i>	JQ716065-67	JQ715944, JQ715945



附图1 基于COI和16S的矢量分析图(横纵坐标均为序列编号, 白色虚线框分别为花水母、软水母亚纲和管水母亚纲序列所在区域, 彩色图例自冷色至暖色表示序列相似性增加)
Fig. S1 Vector analyses based on COI and 16S sequences. Left and bottom axis are sequence numbers. White dash line box indicate sequences of Anthomedusae and Leptomedusae, Siphonophorae, respectively. Cold to warm color bars indicate the increase of sequence similarity.