

学校编码: 10384

分类号 \_\_\_\_\_ 密级 \_\_\_\_\_

学号: 21720081152554

UDC \_\_\_\_\_

廈門大學

硕士学位论文

DNA 条形码对鹭类和猛禽类鸟类的  
识别和鉴定

DNA Barcoding discriminates the Ardeids and Raptors

高航

指导教师姓名: 陈小麟 教授

专业名称: 遗传学

论文提交日期: 2011 年 4 月

论文答辩时间: 2011 年 6 月

学位授予日期: 2011 年 月

答辩委员会主席: 刘迺发 教授

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2011 年 4 月

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为( )课题(组)的研究成果,获得( )课题(组)经费或实验室的资助,在( )实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，  
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

# 目 录

摘要	I
Abstract	III
第一章 前言	1
1.1 DNA条形码概述	1
1.2 鹭科与猛禽分类研究概述	10
1.3 本论文研究目的和意义	12
第二章 材料与方法	15
2.1 实验材料	15
2.2 仪器与试剂	15
2.3 实验方法	16
2.4 数据处理与分析	23
第三章 结果与分析	25
3.1 COI基因在鹭科鸟类中进行DNA条形码研究	25
3.2 COI基因在更多鸟类群中进行DNA条形码研究	34
3.3 博物馆陈旧标本的微型DNA条形码研究	41
第四章 讨论	47
4.1 COI基因进行物种鉴定的标准	47
4.2 DNA条形码识别鹭科鸟类的效果检验	47
4.3 COI条形码探讨系统发育关系	49
4.4 微型DNA条形码在鸟类中的应用	52
第五章 结论和展望	53
5.1 结论	53
5.2 展望	53
参考文献	55
附 录	65
致 谢	81

# Contents

<b>Abstract in Chinese</b> .....	I
<b>Abstract in English</b> .....	III
<b>Chapter 1 Introduction</b> .....	1
1.1 Overview of DNA Barcoding .....	1
1.2 Overview of species classification of Ardeids and Raptors .....	10
1.3 Purpose and Significance of present study .....	12
<b>Chapter 2 Materials and Methods</b> .....	15
2.1 Materials .....	15
2.2 Instruments and Reagents .....	15
2.3 Methods .....	16
2.4 Data processing and analysis .....	23
<b>Chapter 3 Results and Analysis</b> .....	25
3.1 DNA Barcoding on Ardeids .....	25
3.2 DNA Barcoding on more bird taxonomic groups .....	34
3.3 Minimalist DNA Barcoding on museum historical specimens .....	41
<b>Chapter 4 Discussion</b> .....	47
4.1 The standard of COI gene for species identification .....	47
4.2 DNA Barcoding discriminates Ardeids .....	47
4.3 Phylogenetic relationships based on COI barcodes .....	49
4.4 Minimalist DNA Barcoding on birds .....	52
<b>Chapter 5 Conclusion and Perspective</b> .....	53
5.1 Conclusion .....	53
5.2 Perspective .....	53
<b>Reference</b> .....	55
<b>Appendix</b> .....	65
<b>Acknowledgements</b> .....	81

## 摘要

DNA 条形码技术是通过选取一段标准化的基因区域来对物种进行分子描述，其在物种鉴定方面已经取得了很大的成功。在动物类群方面，线粒体 COI 基因 648 bp 片段被选为 DNA 条形码标准序列来实现对物种进行鉴定，这是由于其在能够保证足够变异的同时又很容易被通用引物扩增。

鸟类的研究工作相对完善，已然成为一个较为稳定和成熟的分类群，给 DNA 条形码研究的开展提供了其他动物类群所无法比拟的优越条件，因此其常被作为检验作为物种鉴定工具的 DNA 条形码有效性的良好模型。本研究检验了线粒体 COI 基因 648 bp 序列在鸟类中进行 DNA 条形码研究的可行性，主要分为两部分：第一部分对新鲜样本开展全长 DNA 条形码研究；第二部分筛选出相对较短的条形码片段用于猛禽博物馆陈旧标本的物种鉴定研究。

第一部分通过对34种鹭科鸟类进行DNA条形码研究发现，绝大多数物种种间遗传距离显著大于种内遗传距离，在近源物种中，同属种间差异平均约是种内差异的8倍，因此物种间能够进行准确的识别和鉴定。在NJ树上，物种间的聚类趋异模式分为四种：单个物种不同个体形成单系列（支持度较高>95%），单个物种不同个体形成单系列（支持度较低），单个物种不同个体形成并系列，多个物种形成单系列。在研究中我们发现部分物种种内差异同地理差异是相关的，即随着地理尺度的变大，其种内差异也会随之增大，但同时，这些物种与同属其他物种间的种间差异则更大，因此利用COI条形码对其鉴定不存在问题。然而，COI条形码却未能将分化时间较晚的年轻物种或存在基因渗入的白鹭属部分近缘物种准确的识别出来。另外，我们又成功获得了其它67种鸟类的83条DNA条形码序列，COI在对其中的14种有序列差异的鸟类鉴定中也不存在问题。

接着我们初步探讨了作为DNA条形码的COI基因在鸟类系统发育分析中的可行性。NJ 树聚类显示大部分物种均能按照种、属、科的分类形成单系，各个分类阶元间的聚类情况与它们的亲缘关系也基本吻合。其中鹭科麻鵝亚科的苇鵝属和麻鵝属、黑鵝属之间相互嵌套，亲缘关系较为混乱，雀形目各科之间 NJ 树聚类解析度也较低，COI 基因不能准确显示它们之间的系统进化关系，建议采用多

个基因联合分析,同时采用进化速率相对较慢的核基因探讨鸟类高级阶元间的系统发育关系。

第二部分我们首先采用模拟实验将 BOLD 数据库中猛禽 230 个样本的序列拆成 3 或 6 段相同大小 (216 bp 或 108 bp) 的片段,选用 Full-barcode、Mini-barcode 216-1 和 Mini-barcode 108-1 三个片段数据集以 Kimura-2-parameter (K2P) 为参数构建 NJ 树,并进行遗传距离分析得出的解析度准确性依次为 84.1%、78.3%、75.2%,其中片段长度及其位置的选择极其重要;然后进行实验验证,设计 PCR 引物扩增 23 个猛禽博物馆陈旧标本的 DNA 条形码指定序列 5' 端 114 bp、中间 103 bp 和 3' 端 121 bp 片段,并结合 17 个猛禽新鲜样本截取后的相应片段共 111 条短片段条形码序列,分别以单一片段和两两组合后的片段序列数据集为分析基础计算物种鉴定的准确性,得出 114+103 bp 合并序列为 85.0%、114+121 bp 为 85.7%。由此得出,微型 DNA 条形码鉴定猛禽物种是可行的,其和 DNA 条形码一样均可作为猛禽物种鉴定的可靠依据。

总的来说,线粒体 COI 基因部分序列用于鸟类的 DNA 条形码研究是可行的;同时,相对较短的条形码序列在对一些难以获得全长条形码序列的标本进行鉴定时仍具有很高的应用价值。另外,更密集的种内和种间采样将会进一步增加 DNA 条形码对物种鉴定的准确性。

关键词: 鸟类; DNA 条形码; 微型条形码

## Abstract

DNA barcoding, the molecular characterization of species using a standardized gene region, has a strong track record for identifying species. For animals, a 648-bp fragment of the mitochondrial gene cytochrome c oxidase subunit I (COI) has been chosen as the standard barcoding marker due to its high interspecific variation, low intraspecific variation, and relatively universal primers for various taxonomic groups.

Birds are among the best-studied and taxonomically well-described animal groups, which makes them good models for testing the efficacy of DNA barcoding as a species identification tool. The present study tested the effectiveness of COI barcode in discriminating birds. In order to test the feasibility of the mitochondrial COI gene for species identification, we performed our research for two parts: in the first part, we determined the COI full-length barcodes for 101 species of modern specimens; in the second part, we explored the use of shorter barcode sequences in species identification for raptors which came from museum whose DNA were degraded.

34 Ardeids were examined by DNA barcoding and the results indicated that the identification of most species were unambiguous because of the existing barcoding gap between intra- and interspecific genetic distances, the genetic differences between closely related species were, on average, about 8 times higher than the differences within species. Four divergence patterns were illustrated in the NJ tree which were monophyletic with >95% or weak bootstrap support and paraphyletic in single species, and monophyletic in multiple species, respectively. We found that sequence divergent was related with geographical distance in some species which but also being identified accurately as a result of the larger congeneric distances. However, COI barcode can hardly differentiate the taxa which might share mtDNA because of hybridization such as *Egretta*. Furthermore, 83 COI barcode sequences of 67 other bird species were obtained successfully, and 14 species among which had intraspecies difference were identified accurately.

Meanwhile, we investigated the phylogenetic relationships of birds through COI barcodes. NJ tree clustering showed that most species which can form monophyletic branch according to species, genus and family were in accordance with their phylogenetic relationships well. Phylogenetic tree revealed that *Ixobrychus*, *Botaurus*



and Dupetor of Botaurinae were nested with each other, and also Passeriformes. Multiple genes joint analysis was advised, as well as supplementation of the mitochondrial barcodes with nuclear ones were needed to explain the phylogenetic relationships of higher categories.

Before the Empirical test, we first tested the *in silico* performance of 'mini-barcodes' (216 bp or 108 bp) in species-level identifications of 230 COI sequences from BOLD system, and calculated the resolution of three segments of full-barcode, mini-barcode 216-1 and mini-barcode 108-1 by neighbour-joining (NJ) analysis. With the segments decreasing, the resolution of species identification lowered (84.1%, 78.3% and 75.2%, respectively). However, the choice of length and position of mini-barcodes was important in their ability to discriminate among species. Then we generated 111 mini-barcodes (100~200 bp) from 5' end, middle and 3' end of DNA barcode, respectively. The combined segments of 114+103 bp and 114+121 bp showed higher accuracy at 85.0% and 85.7%, as compared to others in species-level identification by NJ analysis. The mini-barcodes which produced species-level resolution congruent with DNA barcode were also valuable for the identification of the raptors whose DNA were degraded.

In all, the finding of large COI sequence differences between species confirms the effectiveness of COI barcodes for identifying the birds. Short barcodes were also effective in identifying specimens, confirming their utility in circumstances where full barcodes were too expensive to obtain. In addition, to bring greater reliability to the identification of species, increased intra- and interspecies sampling is needed.

Keywords: Birds; DNA barcode; Mini-barcode

## 第一章 前言

### 1.1 DNA 条形码概述

#### 1.1.1 DNA 条形码技术简介

条形码技术最早的提出和应用是在零售业,近几年一些生物学家把它应用在DNA的分析方面,提出DNA信息在数据形式方面可以作为Barcoding分析的原始数据即DNA条形码技术(DNA barcoding)。DNA条形码是利用标准的、有足够变异的、易扩增且相对较短的DNA片段(DNA barcode)在物种种内的特异性和种间的多样性而创建的一种新的生物身份识别系统,它可以对某些物种进行快速的自动鉴定<sup>[1]</sup>。理论上,这段短序列可以区分并鉴定地球上所有物种。自从DNA条形码的概念被提出以来,这种新兴的分类学技术已经成为了生物分类学研究中引人注目的新方向<sup>[2]</sup>,其实质是作为一种新的性状来构建分类系统,实现序列本身变异信息与现有形态分类学的结合<sup>[3-8]</sup>,加快全球生物物种分类和鉴定的步伐<sup>[9]</sup>,并且能够在分类学修订、新种和隐存种的发现以及资源利用等生物多样性研究方面提供新的思路和研究工具<sup>[10-12]</sup>,同时将分类学结果应用于生态学调查、濒危物种监测和保护、中草药资源鉴定、法医鉴定、药物和食品市场监督等领域<sup>[13-17]</sup>。

#### 1.1.2 DNA 条形码的产生与发展

DNA条形码是一门新兴技术,Tautz等(2002)首先提出用DNA序列作为生物分类系统的主要平台,即DNA分类学(DNA Taxonomy)<sup>[18]</sup>。动物学家Paul Hebert等<sup>[1]</sup>(2003)首先倡导采用线粒体细胞色素C氧化酶I亚基(cytochrome c oxidase I, COI)上的一段基因序列作为DNA条形编码的基础,并且确定了在动物鉴定中的作用,同时计划给所有生物物种进行编码,因此他被称为DNA条形编码之父<sup>[15]</sup>。

2003年,多位分类专家、分子生物学家和生物信息学家会聚美国冷泉港,分别召开了题为“TAXONOMY AND DNA”和“Taxonomy, DNA and the Barcode of Life”的两次研讨会,提出对全球所有生物种的某个特定基因进行大规模测序,以期实现物种鉴定的目标,进而推进生物进化历史的研究,并且还提出了国际生物条形编码计划(International Barcode of Life Project)的发展蓝图<sup>[19]</sup>。

同年7月，生物条形码网站 (<http://www.barcodinglife.com>) 开通，为全球所有研究者提供有关生物条形码研究的信息。

2004年，Alfred Sloan基金会在华盛顿Smithsonian国家自然历史博物馆创立了生命条形码联盟 (Consortium for the Barcode of Life, CBOL)，致力于建立鉴定生物物种的全球标准。同年秋，美国国家生物技术信息中心 (NCBI) 与CBOL合作，宣布为标准DNA条形码序列及相关支持性数据提供检索服务，物种条形码的标准DNA序列及其相关数据将存档于GenBank

([www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/taxonomyhome.html/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/taxonomyhome.html/))。

2005年2月，由CBOL和英国自然历史博物馆主办的生命条形码协会第一次国际会议在伦敦召开，讨论决定为1000万物种建立条形码库。2007年9月在台北召开的第二次及2009年11月在墨西哥召开的第三次国际DNA条形码会议上，都对理想条形码的选择给予了高度重视，对在全球推进DNA条形码研究计划起到了重要作用。

DNA条形码自2002年诞生以来，得到了迅速的发展。截至2010年6月底，在基因条形码数据库中已经收录了来自122935种生物的894514条序列，其中来自21900种生物的236090条序列符合基因条形码标准，可供参考使用 ([http://www.Barcodinglife.org/views/tax\\_browser\\_root.Php](http://www.Barcodinglife.org/views/tax_browser_root.Php))。由于CBOL的支持，人们已经开展了一系列的DNA条形码计划，包括：所有鸟类的All Birds Barcoding Initiative计划<sup>[20]</sup>、鱼类的Fish Barcode of Life Initiative计划<sup>[21]</sup>、所有鳞翅目昆虫的All Lepes Barcode of Life计划<sup>[22]</sup>和世界性入侵有害物种鉴定也在积极的开展<sup>[23]</sup>，之后又对脊椎动物的鉴定<sup>[24]</sup>进行了探索。

### 1.1.3 DNA 条形码技术的原理及其研究方法

#### 1.1.3.1 DNA 条形码目标基因的选择及其识别原理

DNA条形码所选用的目标基因必须具备以下四个特征：①必须是一段标准的DNA区来尽可能区分鉴别不同的分类群；②应当包含足够的系统进化信息以定位物种在分类系统（科、属等）中的位置；③应该具有便于通用引物的设计的保守区域；④应该足够的短以便于DNA的扩增。在线粒体基因组的13个蛋白编码基因中，COI和Cytb基因的进化速率较慢而且稳定，因此具有优越性。其中COI的通用引物能够扩增大多数动物COI基因5'端的序列，而且COI序列比Cytb拥有更多

的系统发育信号，COI在基因序列上的变化比Cytb还要慢而稳定，所以更适合解析亲缘关系密切的分类类群<sup>[25]</sup>。大量的研究表明尽管COI序列进化速率较慢，但是即使亲缘关系很近的类群其序列依然存在几个百分点的差异，因此COI条形码依然具有很高的物种鉴定可靠性，也是目前动物物种鉴定的首选基因片段。

Hebert等最终选定了一段从COI（线粒体细胞色素C氧化酶亚基I）基因5'端开始的58-705的648 bp长的碱基序列作为标准DNA条形码<sup>[26]</sup>，因为其在能够保证足够变异的同时又很容易被通用引物扩增，而且目前研究结果表明，其DNA序列本身很少存在插入和缺失（即使有少数也主要分布于该基因的3'端，对结果的分析不会造成很大的影响），同时，它还拥有蛋白编码基因所共有的特征，即密码子第3位点碱基不受自然选择压力的影响，可以自由变异。

DNA序列中每个碱基位点有A、T、C、G四种可能的情况，那么理论上一个长度为15 bp的序列，就能出现 $4^{15}$ （大于10亿）种编码方式，远超过估计的动物物种数。当然由于进化选择压力，一些位点是不变的，这个约束可以通过选择蛋白编码基因，延长编码长度来解决，蛋白编码基因的第三密码子通常可以发生改变，一个长度为45 bp的序列就能够产生近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<sup>[27]</sup>。

### 1.1.3.2 DNA条形码的研究方法

DNA条形码的整个工作流程为（图1）：①样品采集和DNA提取；②设计和筛选通用引物，优化PCR反应条件，测序；③序列分析，将所有序列进行两两比较，明确该序列的种内与种间变异率，确定该段序列是否适合作为DNA条形码；④结果提交至DNA条形码数据库。整个流程即是通过通过对一组来自不同生物个体的短的同源DNA序列（约650 bp）进行PCR扩增和测序，随后对测得的序列进行多重序列比对和聚类分析，从而将某个体精确定位到一个已描述过的分类群中。对某些物种来说，甚至还具有足够的结构特征可将其定位到特定的地理种群，线粒体DNA系统地理学的研究已经证实了这一点<sup>[28]</sup>。DNA样品的纯度及来源的可靠性决定着整个Barcoding分析的可信度，与此同时，数据库的完整性及信息量的大小

也直接影响着最后物种鉴定和系统进化分析的结果。Ratnasingham和Hebert<sup>[29]</sup>明确指出提交动物条形码序列应包含以下信息：①物种信息（名称、性别、生长阶段和繁殖过程、分类地位）；②凭证标本信息（目录、馆藏号和提供样本的单位）；③采集信息（采集人、采集日期和GPS定位的采集地点）；④标本鉴定人；⑤DNA条形码序列（基因名称和位置、PCR扩增引物、比对细节）；⑥序列峰图。并要求配有物种照片、采集地、形态特征等相关信息的文字描述。

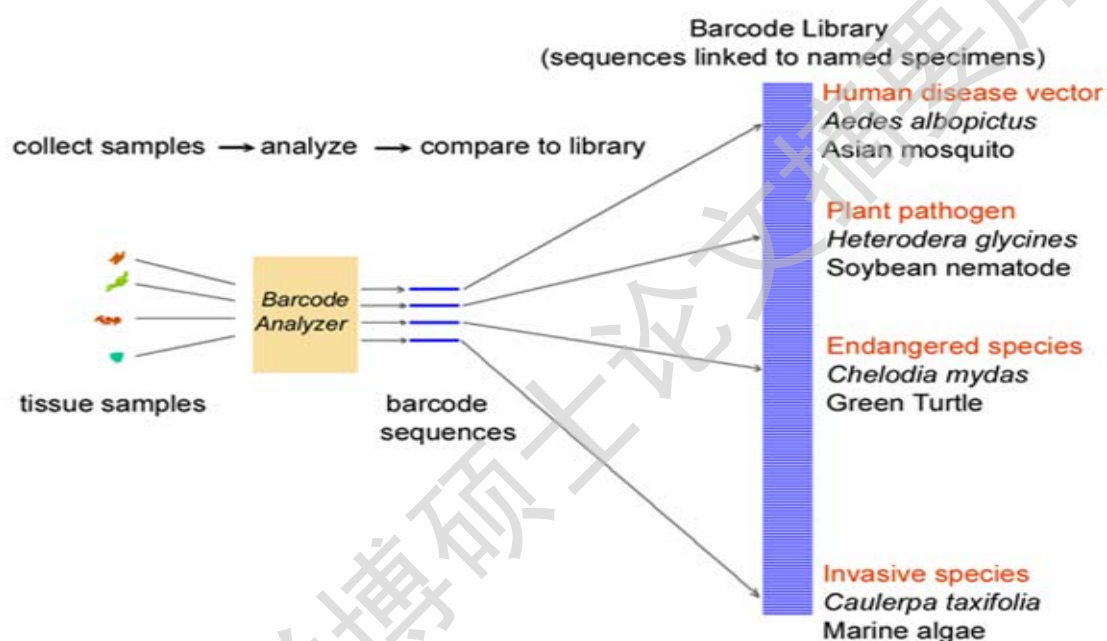


图1 DNA Barcoding 操作流程（引自 BOLD）

Fig.1 Operation process of DNA Barcoding (By BOLD)

DNA条形码研究的目的是将目标序列与生命DNA条形码数据库（Barcode of life data systems, BOLD）中的已知序列进行比对分析。当前的BOLD运用序列相似度和系统进化树相结合的研究方法。首先，近似法搜索全部数据以缩减相匹配科、属的序列数据，采用分类统计和系统进化工具确定查询的序列，若找不到匹配序列，就用基于生物分类的种群遗传方法，但查询序列的分类鉴定方法有一定的不确定性<sup>[30]</sup>；其次，将查询后的序列通过MEGA4.0软件建立NJ

（Neighbor-Joining）树，分析目的序列和相邻近序列的进化关系<sup>[31]</sup>，从最邻近参考序列来确定物种种名。此种方法直接快速，但主要缺点是对选样准确性的依赖较强，而且计算相似度和遗传距离会使表型特征信息丢失，对种间和种内变异

依赖也较强，且采样不全会人为增加上述方法的假阳性<sup>[32]</sup>。

#### 1.1.4 DNA 条形码研究进展

##### 1.1.4.1 DNA 条形码用于新鲜样本研究

随着DNA条形码技术研究的不断深入，越来越多的研究都表明此项技术能够准确地对各物种类群进行鉴定和分类。

在动物中，Hebert等2003年对动物界中除刺胞动物门外的其他动物门，共11门13320个物种的COI基因序列进行分析，发现其在种内和种间差异的阈值能够很好地区分所有研究物种，因此，他们认为在动物界中COI基因是合适的DNA条形码标准基因，其在相当程度上如实反映了物种之间的真实进化关系<sup>[1]</sup>。Vences等探讨DNA条形码对国际上分类混乱的两栖爬行类物种的鉴定能力，结果显示选用的COI基因不仅能够准确的鉴别出各物种，而且还能无误地识别出其不同地理类群的变异<sup>[33]</sup>。对北美哥斯达黎加地区1000多种鳞翅目昆虫生物多样性的调查中，Janzen等利用DNA条形码的COI基因序列建立一个分类学平台，能够鉴定物种以及发现这一区域存在的模糊物种等，并且能准确鉴定97%的物种，其余不能被确认的物种是亲缘关系极近的物种或形态定义模糊的物种，因此其研究认为DNA条形码能够很好的协助一地区生物多样性调查<sup>[34]</sup>。迄今为止，COI基因在动物分类鉴定中被证明是行之有效的，包括腹足类、蝶类、弹尾目、有翅目昆虫、鱼类、蚁类、甲壳类和新近研究的硅藻属、原生动物等的鉴定<sup>[35]</sup>。

在高等植物中，由于线粒体DNA碱基置换速率低，变异很小，COI片段不适于做植物分类鉴定<sup>[36]</sup>，生命条形码协会植物工作组同意用多基因标记植物条形码来鉴定相关亲缘种<sup>[37-39]</sup>。被提议的有编码基因片段（*rpoB*, *rpoC1*, *matK*, *rbcL*, *UPA*）和非编码区片段（*trnH-psbA*, *atpF-atpH*, *psbK-psbI*），此外还有核基因ITS。目前，尚处于对所提议的各片段组合比较和评价阶段，当前多数研究者倾向于*matK*和*trnH-psbA*这2个片段参与组合，而第3个片段将可能是Kim等提出的*atpF-atpH*或*psbK-psbI*片段<sup>[40]</sup>。此外，片段组合后分析应该分步进行，编码基因选择压力大，变异通常较小但通用性好，应该先用编码基因锚定到科或属，再用变异更大的片段（编码或非编码的）区分到种。

DNA条形码在其他领域研究也有很大进展，COI可以用于少数真菌目、藻类和原核生物（草履虫和四膜虫），但要达成预期的标准化还比较困难，目前普遍认

为仅用线粒体COI基因序列比对解决近缘物种基因进化率、遗传距离差异、线粒体DNA渗入过程和基因间隔差异有很大难度，基于单一位点的序列分配方法常常缺乏精确性<sup>[41]</sup>。

鸟类基于形态学、遗传学和行为学等方面的研究工作比较完善，已然成为一个较为稳定和成熟的分类群<sup>[42]</sup>，给DNA条形码技术研究的开展提供了其他类群所无法比拟的优越条件。Hebert等对260种北美洲鸟类的COI基因序列进行研究发  
发现，每一种鸟类都有各自不同的COI条形码，通过对这种条形码的分析，很容易进行分类，证实了COI基因对于鸟类物种鉴定的有效性<sup>[43]</sup>。此后，国际上一些鸟类学家和分子生物学家一起于2005年9月成立了“All Birds Barcoding Initiative”，即ABBI，目标在于为期5年内搜集全世界已知近万种鸟类物种的DNA条形码标准遗传数据，每个物种至少5条记录。尽管已有几百年分类研究历史，包括利用DNA条形码的遗传研究揭示依然有数以百计的鸟类尚未被描述，同时鸟类DNA条形码研究计划也有利于加速新种的发现，提供可靠的标本鉴定工具，并开辟科学调查的新途径<sup>[44]</sup>。鉴于NCBI，EMBL（European Molecular Biology Laboratory）和DDBJ（DNA Data Bank of Japan）中的序列数据也不是完美的，可能会产生样本污染、序列错误、鉴定错误或其他分类问题，ABBI作为全球鸟类推行保存物种分类鉴定观点的组织，其职责是描述凭证标本（如DNA标记、形态分类、样本细节、采集信息、凭证标本照片等），并允许修正形态特征和重测已保存的序列。其研究人员正在建立DNA条形码、凭证标本以及相关采集信息对接的电子图书馆和界面，这个图书馆会成为保护计划者、鸟类学家、生态学家、公共卫生官员和其他有兴趣公众的有价值工具，如通过鉴定鸟撞的羽毛、组织残迹，助于提高航空安全等。目前针对鸟类DNA条形码的研究发现：COI在鸟类种内变异远远小于种间，因此具有物种的稳定性；COI条形码能发现新的鸟种，即使研究很好的类群，因此推测若用在博物馆标本中，可能会发现新种。然而，一些具有共享或重叠COI序列的物种发现都是进化较晚的物种或常有杂交的类群，有些可表现出种内的种群明显分化，这些是在应用COI片断时需要注意的地方<sup>[43]</sup>。

#### 1.1.4.2 微型DNA条形码用于博物馆陈旧标本研究

DNA条形码引起广泛关注在于它有助于物种的鉴定与发现新物种。但是，目前存在着采样的缺陷，Meyer and Paulay检测了DNA条形码的分类效果，通过对

多个物种的分析, 比较了种内变异 (intraspecific variation) 和种间趋异 (interspecific divergence), 发现总的最低出错率为4%, 尤其在样品不完整的情况下, 出错较为严重。因此, DNA barcoding只有在对具有可靠的分类学基础, 以及采样丰富的类群研究时才彰显可靠<sup>[27]</sup>, 这也是目前DNA条形码用于分类研究的缺陷。目前, 大多数关于DNA条形码的研究都集中在新鲜样本上, 然而在很多情况下, 新鲜样本的采集工作既耗时、费力又花费昂贵, 采样毕竟有限。此时, 储量巨大且种类丰富的博物馆陈旧标本 (>10年) 就可以用于解决这一难题, 从而增加DNA条形码进行物种鉴定和分类的可靠性。将新鲜样本和数以百万计的博物馆陈旧标本进行比较分析, 尤其是当DNA条形码显示出一些曾被视为同一个物种的隐种, 并且这些物种仅靠传统的形态学方法难以鉴别并与正模标本相匹配的时候<sup>[34, 43]</sup>, 就显得更为迫切, 同时新鲜样本完整有效的DNA条形码记录也必须包括每个物种与其对应的正模标本的比较信息。此外, 博物馆陈旧标本的DNA条形码研究对于构建覆盖广阔地域的各个物种类群数据库也提供了一种性价比较高的有效途径。

但是, 博物馆陈旧标本 (>10年) 年代较为久远, DNA降解较为严重, 此时通用引物就显得无能为力, 因此难以获得完整的DNA条形码信息, 即得不到完整的COI基因指定648 bp片段, 给物种的有效鉴定带来困扰<sup>[45]</sup>。从陈旧标本中成功获得DNA片段长度取决于标本的保存方法、采集时间和一系列的环境影响因素<sup>[46]</sup>, 自然降解的DNA使得我们很难获得片段长度大于300-400 bp的片段。当然, 依靠DNA修复酶可以解决由于年代久远造成的DNA降解和损伤之类的问题, 从而提高PCR扩增成功率, 但此种方法的缺陷诸如对片段DNA修复的局限性、花费昂贵等限制了其广泛使用。微型DNA条形码 (Minimalist barcode, 简称为mini-barcode) 即是针对博物馆标本的鉴定提出的, 相对完整的DNA条形码指定序列而言, 100-200 bp左右的序列易于扩增获得。在昆虫类群中应用mini-barcodes进行物种鉴定几乎可以鉴别出所有的物种, 表明较短的片段同样适用于物种鉴定。然而, mini-barcodes与full-barcode比较来看, 其应用范围有很大的局限性, 仅限于已经明确的分类群<sup>[47]</sup>。Hajibabaei等在澳大利亚鱼类中选取了112个属, 204个物种的697个个体, 又在鳞翅目昆虫中选取了4个属61个物种的522个个体, 比较了100 bp等较小长度的COI基因部分序列与标准的600 bp左右的序列辨别物种的能力, 较小片段与标准片段在90%以上的比较中都可以得出相同的结果, 也就是



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库