

王兴霞,徐磊,王亮根,等. 基于 COI 基因序列的长腹剑水蚤系统进化关系[J]. 海洋学报, 2018, 40(6): 92—103, doi:10.3969/j.issn.0253-4193.2018.06.009

Wang Xingxia, Xu Lei, Wang Lianggen, et al. Molecular Phylogenetic of *Oithona* based on COI sequence[J]. Haiyang Xuebao, 2018, 40(6): 92—103, doi:10.3969/j.issn.0253-4193.2018.06.009

# 基于 COI 基因序列的长腹剑水蚤系统进化关系

王兴霞<sup>1,2</sup>, 徐磊<sup>1,3,4</sup>, 王亮根<sup>1,3,4</sup>, 陈骁<sup>5</sup>, 郑媛媛<sup>1,6</sup>, 王雪辉<sup>1,3,4</sup>, 杜飞雁<sup>1,3,4\*</sup>

(1. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 广东 广州 510300; 2. 上海海洋大学海洋科学学院, 上海 201306; 3. 广东省渔业生态环境重点实验室, 广东 广州 510300; 4. 农业部南海渔业资源开发利用重点实验室, 广东 广州 510300; 5. 华南农业大学海洋学院, 广东 广州 510642; 6. 汕头大学理学院, 广东 汕头 515063)

**摘要:** 长腹剑水蚤属(*Oithona*)是广泛分布于海洋近岸和外海海域的中小型桡足类中最为丰富的类群之一, 由于个体小且形态差异微小, 通过传统的形态学分类法对其进行准确鉴定难度较大。本文对南海分布的长腹剑水蚤属内的 5 个种, 即瘦长腹剑水蚤(*O. tenuis*)、羽长腹剑水蚤(*O. plumifera*)、刺长腹剑水蚤(*O. setigera*)、伪长腹剑水蚤(*O. fallax*)和长刺长腹剑水蚤(*O. longispina*)线粒体 COI 基因序列以及 DNA 数据库中长腹剑水蚤属其他地区种类 COI 基因序列进行比较分析, 使用 ABGD(Automatic Barcode Gap Discovery)和 GMYC(Generalized Mixed Yule Coalescent)模型进行物种界定, 分析种间种内遗传距离, 并构建系统进化关系。结果显示 ABGD 和 GMYC 模型均可以很好地对长腹剑水蚤进行种类划分; 种内遗传距离为 0.0%~1.6%, 种间遗传距离为 17.7%~44.5%(Kimura 2-parameter 双参数模型), 表明种间出现较高的分化; 贝叶斯系统树和最大似然树进化树结果均表明, 简长腹剑水蚤(*O. simplex*)与其他种类相距较远, 羽长腹剑水蚤和拟长腹剑水蚤(*O. similis*)中存在隐种的分化, 分别是我国南海海域和地中海的羽长腹剑水蚤以及朝鲜海峡和北海的拟长腹剑水蚤, 种间遗传距离分别为 18.6%、22.9%。

**关键词:** 系统进化; 长腹剑水蚤; COI 基因; DNA 分类

中图分类号: Q179

文献标志码: A

文章编号: 0253-4193(2018)06-0092-12

## 1 引言

桡足类(Copepods)动物属于节肢动物门(Arthropoda)、甲壳动物亚门(Crustacea)、颚足纲(Maxillopoda)。由于其种类丰富, 数量大, 被称为海洋中的昆虫<sup>[1]</sup>。桡足类作为海洋食物网中重要的中间环节, 以单细胞生物和桡足类幼虫为食, 同时为仔鱼和其他

食浮游动物的动物供给饵料; 另外作为食屑者参与微食物环, 在碳循环中的细菌碳和藻类碳向高营养级转化过程中起到重要作用<sup>[2-4]</sup>, 对于整个海洋生态系统结构与功能的维持扮演重要角色。从 20 世纪 30 年代到现在一直都是重要的研究对象<sup>[5]</sup>。

长腹剑水蚤属(*Oithona*)作为海洋中小型桡足类最为丰富的类群之一, 在海洋生态系统中同样具有重

收稿日期: 2017-10-22; 修订日期: 2018-01-08。

基金项目: 国家自然科学基金项目(41406188); 中国水产科学研究院南海水产研究所中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金资助(2016TS24, 2017YB26); 国家科技支撑计划项目(2013BAD13B06); 农业部财政重大专项(NFZX2013)。

作者简介: 王兴霞(1994—), 女, 山东省临沂市人, 主要研究方向为浮游动物分子生物学。E-mail: wxhappy1030@163.com

\* 通信作者: 杜飞雁(1974—), 研究员, 主要研究方向为海洋生态学研究。E-mail: feiyanegg@163.com

要的研究意义<sup>[6]</sup>。目前全球记录的长腹剑水蚤有 51 种。长腹剑水蚤属的分类依据主要采用形态学鉴定,需要对关键部位解剖并借助显微镜观察,但由于个体微小,形态特征不显著,造成了形态鉴定的困难,也导致了分类学上的混乱<sup>[7-10]</sup>。而随着基因标记的使用,长腹剑水蚤属内的一些隐种也随之被发现。Ueda 等<sup>[11]</sup>基于核糖体 28S rDNA 与 COI 基因序列分析两个不同盐度区域分布的异长腹剑水蚤(*O. dissimilis*),发现这两个区域的异长腹剑水蚤可能是两种不同的长腹剑水蚤;Jungbluth 和 Lenzl<sup>[12]</sup>分析不同河口区的脆长腹剑水蚤(*O. attenuate*)、*O. oculata* 和简长腹剑水蚤(*O. simplex*),发现这 3 种长腹剑水蚤种内产生一些区域亚种。Cornils 等<sup>[13]</sup>基于 COI 基因序列对不同海域的拟长腹剑水蚤进行研究,同样发现不同海域的拟长腹剑水蚤之间存在隐种的分化。长腹剑水蚤在我国海域也有较为广泛的分布,目前我国海域已记录的长腹剑水蚤有 21 种,其中渤海发现有 3 种,黄海 16 种,东海 17 种,南海 15 种,各海域优势种不同<sup>[14]</sup>,拟长腹剑水蚤(*O. similis*)、短角长腹剑水蚤(*O. brevicornis*)为各海域共有<sup>[15]</sup>,且拟长腹剑水蚤是分布最广泛的种类,在各海域及海湾中都以优势种存在,如渤海、胶州湾等<sup>[16-18]</sup>。

南海处于中国最南端的热带海域,与相邻海区之间有许多通道,为海水交换的必经之地。岛屿众多,具有深海盆地,季风盛行,气候复杂,使得南海具有独特的生态和水文环境,是生物多样性最为丰富的海域之一,因此南海具有重要的研究价值<sup>[19-20]</sup>。由于独特的水域环境,南海的长腹剑水蚤具有耐高温高盐的特性,且数量季节变动和种类季节更替比其他海域稳定;秋季数量最高,各季节的优势种不同。高数量区出现在近岸海域,其数量变化与温度、盐度、叶绿素含量有着密切关系<sup>[21-22]</sup>。Wang 等<sup>[23]</sup>研究结果表明南海长腹剑水蚤种群结构组成受叶绿素、温度、幼鱼与鱼卵的影响,且温度为主要因素;并表明长腹剑水蚤在食物网中参与初级生产者与幼鱼间的物质流动。但目前对于南海分布的长腹剑水蚤研究仍以形态学分类为基础,难以得到完整的种属间系统关系,影响了南海食物网结构与生态系统相关研究的深入开展,因此利用分子系统学手段研究长腹剑水蚤的系统进化关系,明确其系统进化与地理分布的关系具有重要意义。本研究将以线粒体 COI 基因作为分子标记,分析中国南海海域 5 种以及 DNA 数据库(GenBank 和 Bold Systems)中 10 种长腹剑水蚤的系统进化关系,

了解长腹剑水蚤属种间的亲缘关系,完善长腹剑水蚤属内的进化系统,为传统的形态学分类提供了重要的分子数据,增加了种类鉴定准确性,为日后长腹剑水蚤的研究提供重要的理论依据。

## 2 材料与方法

### 2.1 样品采集与 DNA 提取

2016 年 11 月至 2017 年 4 月分别于南海不同海域进行样品采集,具体采样站位点见图 1,使用中型浮游生物网(网目大小 0.077 mm)由底至表垂直采集水深 0~200 m 范围内浮游动物。现场用 95%乙醇固定,4℃低温保存。

样品在解剖镜下根据体型、额角、腹肢、生殖节等形态特征,参照《中国海浮游桡足类图谱》进行种类鉴定。由于长腹剑水蚤属外有几丁质外壳,DNA 提取时需充分破碎。首先将样品放到加有 80  $\mu$ L 磷酸缓冲液的破碎管中,加入破碎珠后放于破碎仪(Tissue Cell-Destroyer)内进行震荡破碎,然后使用 DNeasy Blood&Tissue Kit 试剂盒(QIAGEN,德国)提取 DNA,具体方法参见试剂盒说明书。提取的 DNA 于 -20℃保存备用。

### 2.2 COI 序列扩增与测序

采用通用引物对 COI 基因进行 PCR 扩增,正反引物分别是 L1384(5' GGT CAT GTA ATC ATA AAG ATA 3')和 H2612(5' GGT CAT GTA ATC ATA AAG ATA TTG 3')<sup>[24]</sup>。扩增体系为 20  $\mu$ L,包括 2  $\mu$ L 10×Ex Taq Buffer(Mg<sup>2+</sup> plus),1.6  $\mu$ L dNTP Mixture,0.15  $\mu$ L TaKaRa Ex Taq (5 U/ $\mu$ L),3  $\mu$ L 模板 DNA 和引物(20  $\mu$ mol/L)各 1  $\mu$ L,ddH<sub>2</sub>O 补充至 20  $\mu$ L。扩增条件:95℃预变性 2 min,94℃变性 20 s,49℃退火 20 s,72℃延伸 2 min,共 40 个循环,最后 72℃充分延伸 8 min,10℃保存。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测,选择有目标条带且亮度正常的 PCR 产物送天一辉远(广州)纯化并采用双向引物测序。

### 2.3 数据处理和系统学分析

#### 2.3.1 数据处理

首先测序获得的原始数据要与对应峰图进行对比检查,确保数据的准确性。然后在 NCBI 数据库中进行 BLAST 比对,确保获取的是目的基因。将本实验获取的 COI 序列与 DNA 数据库上下载的序列在 BioEdit 软件中进行同源比对,删除两端不对齐序列,获得的 COI 基因序列用于后续分析。利用 MEGA6.0 计算碱基组成,转换颠换等信息;利用 Kimura 2-pa-

parameter 模型计算遗传距离,参数设置如下:自举法 (boot rapping method),运行次数 1 000 次的估算方法,转换和颠换的核苷酸替代,相同的进化率,删除缺

失位点;并对序列可识别位点,简约信息位点,变异位点,单一变异位点等进行统计。

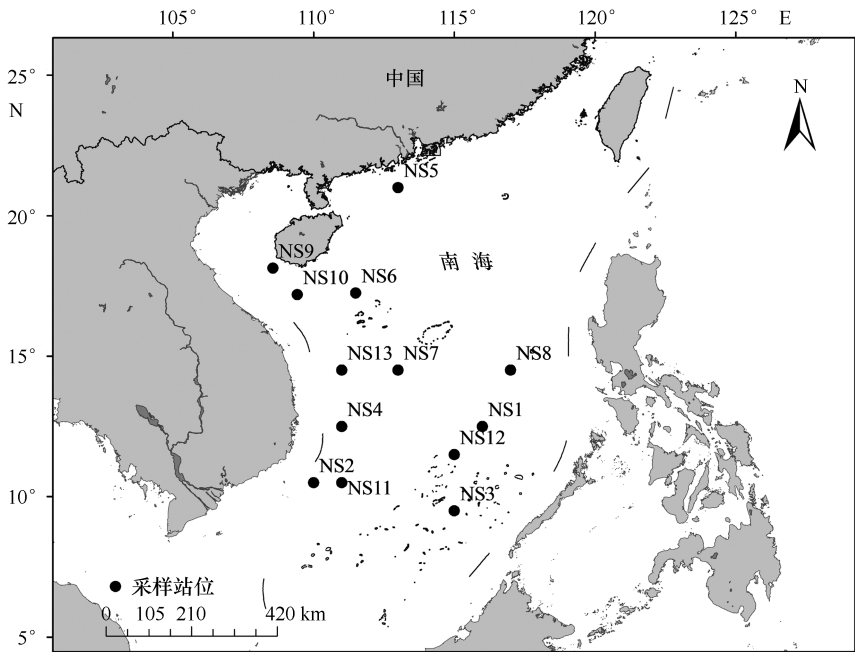


图 1 采样点分布示意图  
Fig.1 Location of sampling sites in the South China Sea

2.3.2 DNA 分类

使用 GMYC (Generalized Mixed Yule Coalescent)<sup>[25]</sup> 模型和 ABGD (Automatic Barcode Gap Discovery) 模型<sup>[26]</sup> 来推测 COI 基因数据集假定的物种界限。对 GMYC 模型,需要没有重复序列的完全二分和有根的超度量树(一个计时图)。我们使用软件 BEAST1.8.0<sup>[27]</sup> 将单独的单倍型建树后作为输入在 R3.1.2<sup>[28]</sup> 软件包“splits1.0 – 19”<sup>[29]</sup> 中运行 GMYC。对于 BEAST 软件 BEAUti1.8.0 的参数设置为:假设具有恒定种群大小的 Yule 模型,不相关的放松分子钟模型(uncorrelated relaxed clock models),GTR 碱基替代模型和  $\gamma$  分布位点模型,马尔可夫链(MCMC)的迭代次数为 100 000 000 次。对于 ABGD,我们同样使用 COI 单倍型序列,使用的是网络版本的默认设置值(<http://www.abi.snv.jussieu.fr/public/abgd/abgdweb.html>)。

2.3.3 系统学分析

利用 Mrmodeltest 2.3 软件对序列数据进行 AIC 最适核苷酸替换模型筛选<sup>[30–32]</sup>。贝叶斯系统进化树的构建使用 MrBayes v3.12<sup>[33]</sup> 软件中马尔可夫链的蒙

特卡洛方法(MCMC)完成。参数设置如下:同时起始 4 条马尔科夫链,即 3 条热链和 1 条冷链,以随机树为起始树,共运行 2 000 000 次,每 100 代抽样 1 次,重复 1 次。在舍弃老化样本(burnin sample)后,根据剩余的样本构建一致树(consensus tree)。以后验概率 (posterior probability, PP) 来表示各分支的可信度,95% 以上时认为该支可靠。

使用软件 PhyML3.0<sup>[34]</sup> 构建其系统发生关系树,该方法使用系统发生推断的似然方法。运行 PhyML 时,使用由 Model Generator 0.851 推荐的 GTR 模型作为两个数据集的碱基替代模型。树搜索使用 NNI 以改进合理的开始树;使用快速的似然方法 aLRT SH-like 作为树的分支支持<sup>[35]</sup>。系统树在软件 FigTree v1.4.0 中展示和编辑。

3 结果

3.1 序列组成分析与 COI 基因分歧度

本实验所得 5 个种 20 条序列与 DNA 数据库中下载 10 个种 19 条序列(表 1)经对比及剪切得到序列长度为 538 bp。其中核苷酸组成中 A:24.5%,G:

18.4%, C: 19.4%, T: 37.6%, 其中 A + T 含量 (62.1%) 高于 G + C (37.8%) 含量, 符合线粒体基因组碱基组成的特点。所有碱基中保守位点为 438 个, 变异位点为 230 个, 单变异位点为 11 个, 简约信息位点为 219 个, 其中 11 个变异位点均是只有 2 个碱基的变异, 没有 3 个以上碱基的变异, 平均转换/颠换 (si/sv) 数为 1.44, 转换数高于颠换数。

利用 Kimura 2-parameter 模型计算 15 种长腹剑水蚤 COI 基因的遗传距离。种内遗传距离为 0.0%~1.6%, 平均遗传距离为 0.53%, 符合 Hebert 等<sup>[36]</sup> 所提出的物种鉴定最小种间遗传距离值 0.02; 种间遗传

距离为 17.7%~44.5%, 平均遗传距离为 32.5%。其中最大遗传距离出现在异长腹剑水蚤与 *Oithona* sp. 之间, 最小在伪冷长腹剑水蚤 (*O. frigida*) 与伪长腹剑水蚤 (*O. fallax*) 之间 (表 2)。

### 3.2 DNA 分类

总计 COI 序列有 20 条扩增成功, DNA 数据库下载 COI 序列 19 条, 且序列覆盖所有的形态学物种。GMYC 对于 COI 基因物种鉴定的结果是 15 个似然实体, 置信区间为 13~16。ABGD 对 COI 距离值的间隔是 0.03~0.16 (图 2), 与 GMYC 模型相同, 同样将 COI 序列集划分成明显的 15 个组。

表 1 长腹剑水蚤属种群位点及序列信息

Tab.1 List of species in *Oithona* examined, with location coordinates, accession number

| 种名                          | 采样点及编号  | 纬度       | 经度        | 序列编号 | 登录号        | 序列来源    |
|-----------------------------|---------|----------|-----------|------|------------|---------|
| 异长腹剑水蚤 <i>O. dissimilis</i> | 日本      | 26.22°N  | 127.42°E  | OD62 | AB604162.1 | GenBank |
|                             |         |          |           | OD63 | AB604163.1 | GenBank |
|                             |         |          |           | OD64 | AB604164.1 | GenBank |
| <i>O. oculata</i>           | 夏威夷     | 21.29°N  | 157.51°W  | OO42 | KC594142.1 | GenBank |
|                             |         |          |           | OO43 | KC594143.1 | GenBank |
|                             |         |          |           | OO44 | KC594144.1 | GenBank |
| 简长腹剑水蚤 <i>O. simplex</i>    | 夏威夷     | 21.25°N  | 157.42°W  | OX50 | KC594150.1 | GenBank |
|                             |         |          |           | OX51 | KC594151.1 | GenBank |
| 伪冷长腹剑水蚤 <i>O. frigida</i>   | 南大洋     | 62.02°S  | 0.07°W    | OF38 | KU982938.1 | GenBank |
| 瘦长腹剑水蚤 <i>O. tenuis</i>     | 南海 NS1  | 12.51°N  | 116.06°E  | SP61 | —          | 本研究     |
|                             | 南海 NS2  | 10.54°N  | 110.09°E  | SP62 | —          | 本研究     |
|                             | 南海 NS3  | 9.59°N   | 115.11°E  | SP63 | —          | 本研究     |
|                             | 南海 NS4  | 12.55°N  | 111.01°E  | SP64 | —          | 本研究     |
|                             | 南海 NS5  | 21.01°N  | 113.23°E  | SP65 | —          | 本研究     |
| 羽长腹剑水蚤 <i>O. plumifera</i>  | 地中海     | 43.69°N  | 7.32°E    | OP59 | KU982959.1 | GenBank |
|                             |         |          |           | OP61 | KU982960.1 | GenBank |
|                             | 南海 NS6  | 17.25°N  | 111.56°E  | OP1  | —          | 本研究     |
|                             | 南海 NS7  | 14.52° N | 113.19°E  | OP2  | —          | 本研究     |
|                             | 南海 NS8  | 14.56°N  | 117.07°E  | OP3  | —          | 本研究     |
| 刺长腹剑水蚤 <i>O. setigera</i>   | 南海 NS9  | 18.14°N  | 108.56°E  | OP4  | —          | 本研究     |
|                             | 南海 NS9  | 18.14°N  | 108.56°E  | OP5  | —          | 本研究     |
|                             | 南海 NS10 | 17.20°N  | 109.42° E | OG1  | —          | 本研究     |
|                             | 南海 NS11 | 10.55°N  | 111.08°E  | OG2  | —          | 本研究     |

续表 1

| 种名                          | 采样点及编号      | 纬度      | 经度       | 序列编号  | 登录号        | 序列来源         |
|-----------------------------|-------------|---------|----------|-------|------------|--------------|
| 拟长腹剑水蚤 <i>O.similis</i>     | 朝鲜海峡        | 34.05°N | 127.59°E | OS70  | JN230870.1 | GenBank      |
|                             |             |         |          | OS71  | JN230871.1 | GenBank      |
|                             | North Sea   | 53°N    | 3°E      | OS45  | KT208745.1 | GenBank      |
| 伪长腹剑水蚤 <i>O.fallax</i>      | 南海 NS11     | 10.53°N | 111.16°E | SP71  | —          | 本研究          |
|                             | 南海 NS12     | 11.61°N | 115°E    | SP72  | —          | 本研究          |
| 长刺长腹剑水蚤 <i>O.longispina</i> | 南海 NS13     | 14.53°N | 111.09°E | SP41  | —          | 本研究          |
|                             | 南海 NS11     | 10.62°N | 111.03°E | SP42  | —          | 本研究          |
|                             | 南海 NS8      | 14.52°N | 117.12°E | SP43  | —          | 本研究          |
|                             | 南海 NS5      | 21.41°N | 113.21°E | SP44  | —          | 本研究          |
|                             | 南海 NS11     | 10.52°N | 111.11°E | SP45  | —          | 本研究          |
|                             | 南海 NS4      | 9.51°N  | 115.52°E | SP46  | —          | 本研究          |
| 细长腹剑水蚤 <i>O.attenuata</i>   | Kaneohe Bay | 21.25°N | 157.47°W | OA39  | KC594139.1 | GenBank      |
|                             |             |         |          | OA40  | KC594140.1 | GenBank      |
| 小长腹剑水蚤 <i>O.nana</i>        | Helgoland   | 55.03°N | 8.45°E   | ON56  | KU982956.1 | GenBank      |
| <i>Oithona</i> sp.          | 加利福尼亚       | 33.60°N | 117.89°W | OSP13 | ZPC08013   | Bold Systems |
| 戴维斯长腹剑水蚤 <i>O.davisae</i>   | 朝鲜海峡        | 未发表     |          | OD88  | KR048988.1 | GenBank      |

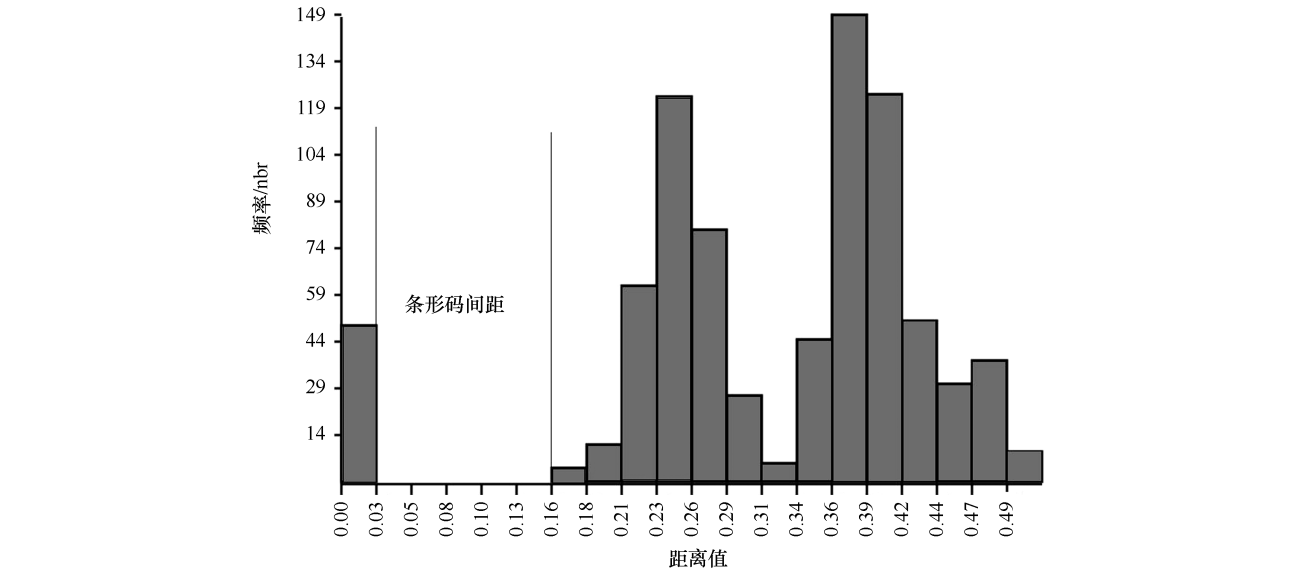


图 2 基于 ABGD 的长腹剑水蚤条形码间隙分析

Fig.2 Barcode gap analysis of *Oithona* species generated by Automatic Barcode Discovery Gap Discovery

表 2 15 种长腹剑水蚤 (*Oithona*) 种内(对角线)和种间(对角线下)的遗传距离(Kimura 2-parameter 模型)  
Tab.2 The genetic distance within (on the diagonal) and between (below the diagonal) 15 *Oithona* in Kimura 2-parameter model

| 1  | 2           | 3           | 4           | 5           | 6           | 7           | 8           | 9           | 10          | 11          | 12          | 13          | 14          | 15          |
|----|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 1  | 0.009±0.003 |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             |
| 2  | 0.387±0.036 | 0.004±0.002 |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             |
| 3  | 0.413±0.038 | 0.341±0.035 | 0.007±0.003 |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             |
| 4  | 0.324±0.031 | 0.332±0.032 | 0.381±0.035 | —           |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             |
| 5  | 0.395±0.037 | 0.229±0.026 | 0.379±0.037 | 0.381±0.036 | —           |             |             |             |             |             |             |             |             |             |
| 6  | 0.362±0.034 | 0.277±0.029 | 0.305±0.031 | 0.336±0.033 | 0.296±0.029 | —           |             |             |             |             |             |             |             |             |
| 7  | 0.383±0.037 | 0.369±0.036 | 0.380±0.036 | 0.374±0.036 | 0.382±0.036 | 0.356±0.035 | —           |             |             |             |             |             |             |             |
| 8  | 0.345±0.034 | 0.395±0.037 | 0.338±0.033 | 0.335±0.034 | 0.398±0.036 | 0.334±0.033 | 0.294±0.030 | 0.002±0.002 |             |             |             |             |             |             |
| 9  | 0.445±0.042 | 0.391±0.039 | 0.397±0.039 | 0.435±0.041 | 0.393±0.037 | 0.365±0.036 | 0.435±0.042 | 0.363±0.034 | —           |             |             |             |             |             |
| 10 | 0.374±0.035 | 0.283±0.029 | 0.363±0.034 | 0.341±0.034 | 0.271±0.029 | 0.238±0.026 | 0.349±0.033 | 0.330±0.031 | 0.322±0.031 | 0.003±0.001 |             |             |             |             |
| 11 | 0.373±0.036 | 0.267±0.028 | 0.361±0.035 | 0.377±0.035 | 0.299±0.030 | 0.211±0.024 | 0.380±0.037 | 0.323±0.032 | 0.346±0.035 | 0.233±0.026 | 0.004±0.003 |             |             |             |
| 12 | 0.367±0.034 | 0.244±0.027 | 0.365±0.035 | 0.328±0.032 | 0.278±0.030 | 0.254±0.027 | 0.407±0.036 | 0.377±0.037 | 0.369±0.036 | 0.245±0.027 | 0.269±0.029 | 0.004±0.003 |             |             |
| 13 | 0.375±0.035 | 0.272±0.028 | 0.352±0.035 | 0.368±0.035 | 0.283±0.028 | 0.183±0.023 | 0.366±0.034 | 0.367±0.035 | 0.392±0.038 | 0.244±0.027 | 0.248±0.028 | 0.252±0.027 | 0.009±0.003 |             |
| 14 | 0.325±0.032 | 0.254±0.027 | 0.335±0.033 | 0.286±0.029 | 0.221±0.025 | 0.177±0.022 | 0.345±0.035 | 0.356±0.035 | 0.425±0.042 | 0.244±0.027 | 0.244±0.028 | 0.225±0.026 | 0.226±0.025 | 0.002±0.002 |
| 15 | 0.368±0.036 | 0.265±0.028 | 0.349±0.033 | 0.378±0.037 | 0.271±0.028 | 0.248±0.028 | 0.403±0.038 | 0.353±0.036 | 0.369±0.038 | 0.290±0.030 | 0.266±0.029 | 0.221±0.025 | 0.186±0.023 | 0.248±0.026 |

注：1.异长腹剑水蚤 *O.dissimilis*, 2.拟长腹剑水蚤<sub>1</sub> *O.similis*<sub>1</sub>, 3.*O.oculata*, 4.筒长腹剑水蚤 *O.simpler*, 5.拟长腹剑水蚤<sub>2</sub> *O.similis*<sub>2</sub>, 6.伪冷长腹剑水蚤 *O.frigida*, 7.小长腹剑水蚤 *O.nana*, 8.细长腹剑水蚤 *O.attenuata*, 9. *Oithona* sp., 10.长刺长腹剑水蚤 *O.longispina*, 11.瘦长腹剑水蚤 *O.temis*, 12.刺长腹剑水蚤 *O.setigera*, 13.羽长腹剑水蚤<sub>1</sub> *O.plumifera*<sub>1</sub>, 14.伪长腹剑水蚤<sub>1</sub> *O.plumifera*<sub>1</sub>, 15.羽长腹剑水蚤<sub>2</sub> *O.plumifera*<sub>2</sub>.

3.3 系统学分析

以哲水蚤属 (*Calanus euxinus*, KC305747.1; *Calanus helgolandicus*, AY604521.1) 为外类群构建贝叶斯和最大似然法系统进化树,两种进化树的分支情况基本一致(图 3,图 4)。本研究所得以及 DNA 数据库上下载的序列与外群分开,其余种类划分为 15

个分歧支,贝叶斯后验概率超过 0.9,最大似然法得到的自举值也都高于 0.7。简长腹剑水蚤与其他种类相距最远。羽长腹剑水蚤和拟长腹剑水蚤发现存在隐种的分化,分别是我国南海海域与地中海的羽长腹剑水蚤;朝鲜海峡与北海海域的拟长腹剑水蚤,后验概率均超过 0.95。

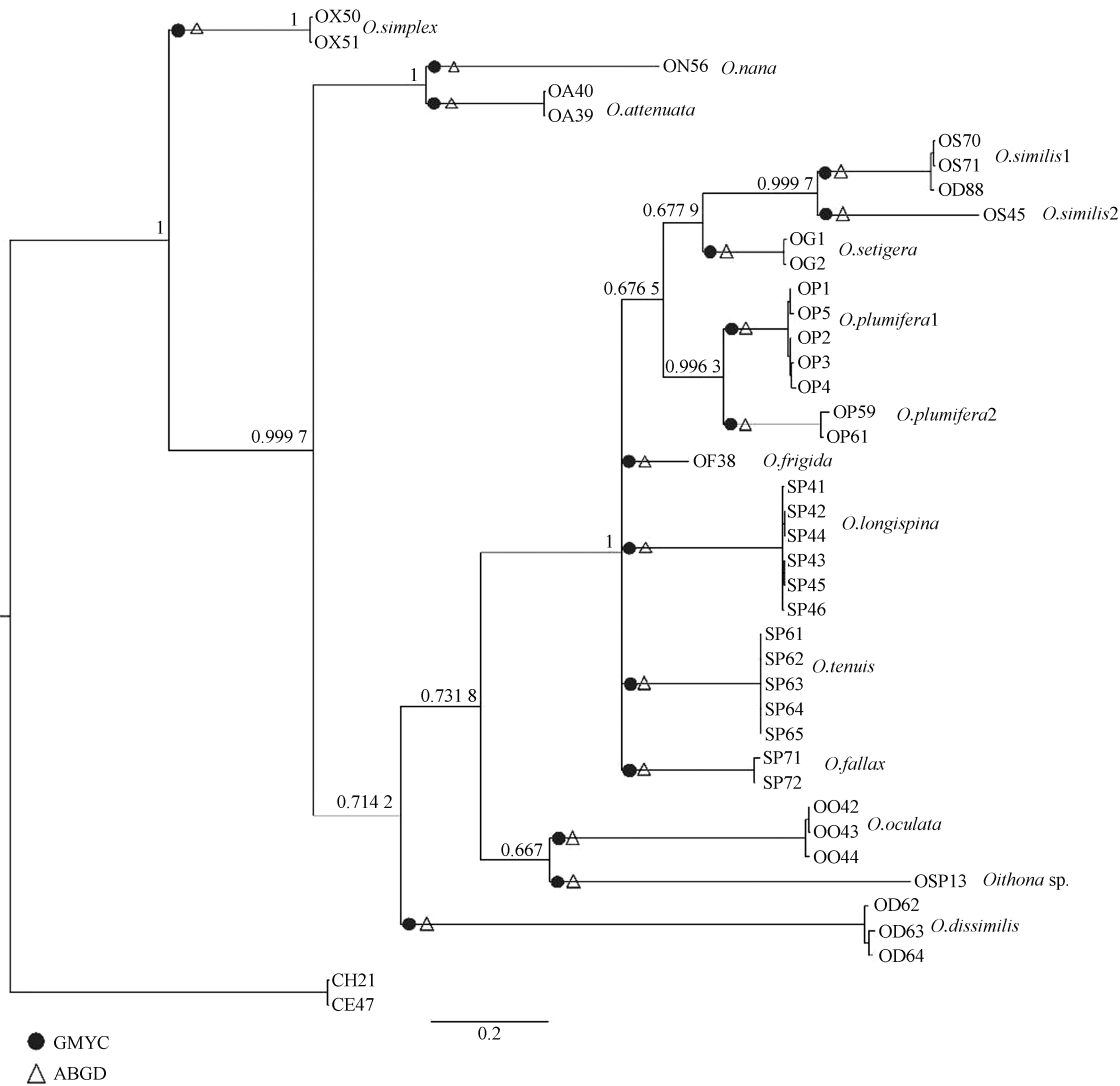


图 3 基于 COI 基因序列构建长腹剑水蚤贝叶斯系统进化树,贝叶斯后验概率(PP)、GMYC 模型和 ABGD 模型节点位置均标于树分支上面(图中的缩写为表 1 中 COI 序列代号)

Fig.3 Bayes phylogenetic tree of *Oithona* base on mitochondria COI gene sequences. Numbers on the nodes are Bayesian posterior probabilities, results of DNA taxonomy from ABGD and GMYC are shown on the node(the population codes are the same as those in Table 1)

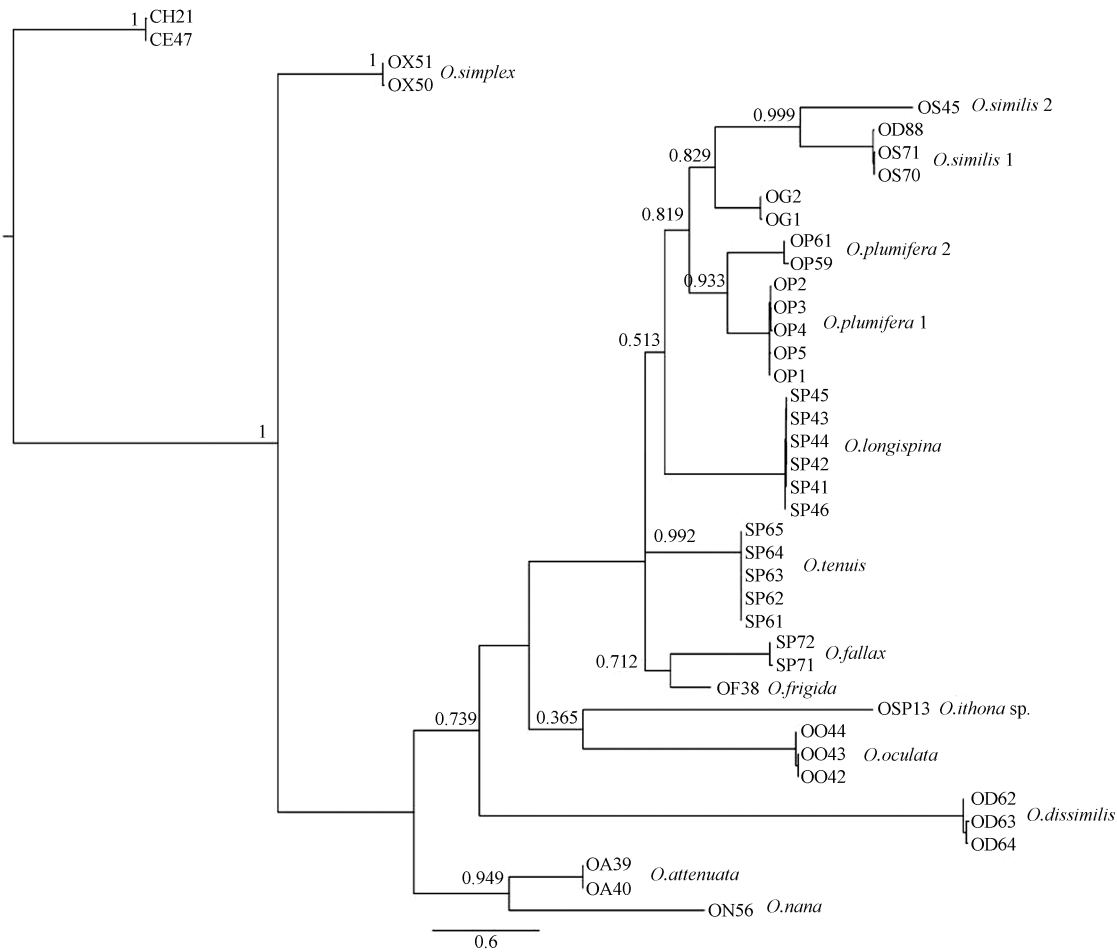


图 4 基于 COI 基因序列构建长腹剑水蚤最大似然法系统进化树,自举支持率(bootstrap values)标注于树分支上面(图中的缩写为表 1 中 COI 序列代号)

Fig.4 Maximum Likelihood phylogenetic tree of *Oithona* base on mitochondria COI gene sequences. Bootstrap values are shown on the node(the population codes are the same as those in Table 1)

4 讨论

4.1 DNA 分类

分子手段诞生之前,桡足类几乎完全依靠形态学数据进行分类;由于个体小,形态差别细微等因素,传统的形态学分类具有很大局限性。分子水平的分类学从遗传物质水平上进行研究,为桡足类的种类鉴定提供了有效的研究方法<sup>[37]</sup>。Bucklin 等<sup>[38]</sup>利用线粒体基因 16S rRNA 解决了长期受争议的 *Metridia lucens* 和 *M. pacifica* 两物种的鉴定问题,两物种 16S rRNA 基因序列差异为 13%,从分子水平上将两物种鉴定为两个种。2003 年 Hebert 等<sup>[39]</sup>首次提出了 DNA 条形码的概念,并表明线粒体 COI 基因具有变异速度适中,可用通用引物扩增的特点。利用线粒体 COI 基因作为分子标记已被广泛应用于研究物种进

化和种类鉴定等方面,Costa 等<sup>[40]</sup>首次验证了 COI 基因作为分子标记应用在甲壳纲种水平上分类鉴定的可靠性,他们通过分析甲壳纲 20 个目共 150 个种类的 COI 基因,研究了甲壳纲的系统进化关系,发现系统进化树的分类情况与形态学分类一致,这充分验证了 COI 基因可以作为分子标记应用于甲壳纲的种类鉴定中。这也为以后利用 COI 基因研究长腹剑水蚤提供了理论依据。本文基于 COI 基因,利用 ABGD 模型和 GMYC 模型进行物种界定<sup>[25-26]</sup>。结果与形态学划分基本一致,分为异长腹剑水蚤(*O. dissimilis*)、拟长腹剑水蚤(*O. similis*)、*O. oculata*、筒长腹剑水蚤(*O. simplex*)、伪冷长腹剑水蚤(*O. feigida*)、小长腹剑水蚤(*O. nana*)、细长腹剑水蚤(*O. attenuata*)、*Oithona* sp.、长刺长腹剑水蚤(*O. longispina*)、瘦长腹剑水蚤(*O. tenuis*)、刺长腹剑水蚤(*O. setigera*)、伪长腹剑水

蚤(*O. fallax*)、羽长腹剑水蚤(*O. plumifera*)以及羽长腹剑水蚤和拟长腹剑水蚤中存在的两个隐种共 15 个种。说明这两种模型均适用于长腹剑水蚤的物种划分。

本研究发现,戴维斯长腹剑水蚤(*O. davisae*, KR048988.1)被 ABGD 模型和 GMYC 模型归为了拟长腹剑水蚤(*O. similis*)一类,两序列均由 Baek 等<sup>[41]</sup>提交到 GenBank,采样点都在朝鲜海峡韩国南部附近海域,且两序列差异度仅为 1.1%。早在 1984 年, Ferrari 和 Orsi<sup>[42]</sup>首次对戴维斯长腹剑水蚤进行鉴定并命名,并且提出戴维斯长腹剑水蚤(*O. davisae*)在形态上与拟长腹剑水蚤具有相似性。因此这极有可能是由于二者形态特征不显著,造成形态鉴定的错误。另外,羽长腹剑水蚤和拟长腹剑水蚤内部分别被 ABGD 模型和 GMYC 模型划分出两个种,说明可能有隐种的存在。两种羽长腹剑水蚤分别来自地中海和中国南海海域,且遗传距离为 18.6%,达到种间的遗传距离;两种拟长腹剑水蚤分别来自朝鲜海峡和北海海域,遗传距离(22.9%)同样达到种间范围。浮游动物游泳能力较弱,也没有能力抵抗水的流动力,不能作远距离的移动<sup>[43]</sup>,因此不同海域的长腹剑水蚤由于长期的地理隔离很有可能产生不同程度的分化,导致生殖隔离,种间分化形成隐种。Cornils 等<sup>[13]</sup>利用 COI 和 28S 基因同样证明了不同海域的拟长腹剑水蚤存在隐种。244 个拟长腹剑水蚤利用 ABGD 和 GMYC 模型进行种类界定得到 7 个分支系(即隐种),后验概率大于 0.95。这充分说明长腹剑水蚤存在隐种的分化是一种普遍现象。

## 4.2 系统进化关系

由于长腹剑水蚤形态鉴定的困难,几乎没有足够的形态数据,并且存在大量隐种,系统进化发育尚未完善<sup>[44]</sup>。本研究基于 COI 基因研究 15 种长腹剑水蚤,进一步完善了长腹剑水蚤属内的系统进化关系。由遗传距离来看,15 种长腹剑水蚤种内平均遗传距离为 0.53%,稍高于 Costa 等<sup>[40]</sup>提出的甲壳纲种内遗传距离(0.46%),这可能由于不同海域种群间的地理隔离造成;而种间遗传距离(17%~44.5%)明显高于 Bucklin 等<sup>[45]</sup>提出的同属内种间遗传距离(13%~22%),这说明长腹剑水蚤属内出现较高的种间分化,遗传差异甚至达到属间的分化范围。例如 *Oithona* sp. 与异长腹剑水蚤、筒长腹剑水蚤、小长腹剑水蚤、伪长腹剑水蚤;异长腹剑水蚤与 *O. oculata*;小长腹剑水蚤与刺长腹剑水蚤、羽长腹剑水蚤的遗传距离均高于

40%。虽然依据前体部分 5 节,头部与第一胸节分开,雌性额角存在或消失,雄性后体部分 5 节,雄性分 6 节,生殖节位于第二节等这些形态特征<sup>[46]</sup>,鉴定均为长腹剑水蚤属,但基于我们对 COI 基因遗传距离的分析,上述几个种类的种间距离已超过 40%,说明长腹剑水蚤属内的一些种类需要重新划分,甚至需要将长腹剑水蚤属拆分为多个属。如果能够获得长腹剑水蚤属内所有种类的 COI 基因数据,并结合形态分类学数据,我们的这一假设才能得到证实。

在系统进化树中,筒长腹剑水蚤、小长腹剑水蚤、细长腹剑水蚤、异长腹剑水蚤最先与其他种类分开,说明为最早分化的种类;拟长腹剑水蚤、羽长腹剑水蚤、伪长腹剑水蚤和伪冷长腹剑水蚤等其他种类汇聚为一支,为最近分化的种类,具有较近的系统进化关系。Cornils 等<sup>[13]</sup>以线粒体 COI 基因和核糖体 28S 基因构建了 9 种长腹剑水蚤的系统进化树,其中异长腹剑水蚤、筒长腹剑水蚤、小长腹剑水蚤同样最先形成分支,与其他种类分开;Cepeda 等<sup>[47]</sup>分析了小长腹剑水蚤、拟长腹剑水蚤和大西洋长腹剑水蚤(*O. atlantica*) 3 者之间的进化关系,其研究结果显示小长腹剑水蚤与另外两种具有较大的遗传距离,系统进化树形成两个分支。这些研究结果均与本研究结果一致。此外,本研究在南海海域共得到 5 种长腹剑水蚤,包括瘦长腹剑水蚤、羽长腹剑水蚤、刺长腹剑水蚤、伪长腹剑水蚤、长刺长腹剑水蚤(*O. longispina*),其中长刺长剑水蚤 2013 年才在南海海域首次被记录<sup>[20]</sup>,这 5 种长腹剑水蚤聚为一支,且亲缘关系较近。鉴于南海海域独特的高温高盐的水域环境,这 5 个种类很可能是由同一种长腹剑水蚤在自然环境选择压力下分化形成,但具体的分化过程还需更多基因数据结合形态数据开展进一步的研究。

**致谢:**样品鉴定得到厦门大学黄加祺教授和许振祖教授、国家海洋局第三海洋研究所陈瑞祥研究员和林茂研究员的指导和帮助,样品采集过程中得到黄洪辉研究员、梁新和王跃中博士等课题组同志们、中国水产科学研究院东海水产研究所程家骅研究员和林楠博士、中国水产科学研究院黄海水产研究所王俊研究员、浙江水产研究所周永东研究员和蒋日进博士、福建水产研究所沈长春研究员、江苏水产研究所汤建华研究员等课题组同志们的帮助,实验过程中得到林琳博士和张殿昌研究员的指导,特致谢忱。

## 参考文献:

- [1] Ferrari F D, Huys R, Boxshall G A. Copepod evolution[J]. Journal of Crustacean Biology, 1992, 12(4): 731.
- [2] 徐兆礼. 中国海洋浮游动物研究的新进展[J]. 厦门大学学报:自然科学版, 2006, 45(S2): 16—23.  
Xu Zhaoli. Advance and future of our study on marine zooplankton[J]. Journal of Xiamen University: Natural Science, 2006, 45(S2): 16—23.
- [3] 张武昌, 张翠霞, 肖天. 海洋浮游生态系统中小型浮游动物的生态功能[J]. 地球科学进展, 2009, 24(11): 1195—1201.  
Zhang Wuchang, Zhang Cuixia, Xiao Tian. Role of microzooplankton in marine planktonic ecosystem[J]. Advances in Earth Science, 2009, 24(11): 1195—1201.
- [4] 王荣, 张鸿雁, 王克, 等. 小型桡足类在海洋生态系统中的功能作用[J]. 海洋与湖沼, 2002, 33(5): 453—460.  
Wang Rong, Zhang Hongyan, Wang Ke, et al. Function performed by small copepods in marine ecosystem[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2002, 33(5): 453—460.
- [5] 张武昌, 张翠霞, 肖天. 海洋浮游生态系统中小型浮游动物的生态功能[J]. 地球科学进展, 2009, 24(11): 1197—1201.  
Zhang Wuchang, Zhang Cuixia, Xiao Tian. Role of microzooplankton in marine planktonic ecosystem[J]. Advances in Earth Science, 2009, 24(11): 1197—1201.
- [6] 刘光兴, 林坚. 遗传标记技术在海洋桡足类生物多样性和系统发生研究中的应用[J]. 中国海洋大学学报, 2007, 37(1): 33—37.  
Liu Guangxing, Lin Jian. Application of genetic marker technique to the study of systematics, biodiversity and phylogenetics for marine copepods[J]. Periodical of Ocean University of China, 2007, 37(1): 33—37.
- [7] Bucklin A, Frost B W. Morphological and molecular phylogenetic analysis of evolutionary lineages within *Clausocalanus* (Copepoda: *Calanoida*) [J]. Journal of Crustacean Biology, 2009, 29(1): 111—120.
- [8] Gallienne C P, Robins D B. Is *Oithona* the most important copepod in the world's oceans? [J]. Journal of Plankton Research, 2001, 23(12): 1421—1432.
- [9] Lischka S, Hagen W. Seasonal lipid dynamics of the copepods *Pseudocalanus minutus*, (Calanoida) and *Oithona similis*, (Cyclopoida) in the Arctic Kongsfjorden (Svalbard)[J]. Marine Biology, 2007, 150(3): 443—454.
- [10] 杨关铭, 何德华, 王春生, 等. 台湾以北海域浮游桡足类生物海洋学特征的研究Ⅲ. 指示性种类[J]. 海洋学报, 2000, 22(1): 93—101.  
Yang Guanming, He Dehua, Wang Chunsheng, et al. Study on the biological oceanographic characteristics of planktonic copepods in the waters north of Taiwan Province Ⅲ. Indicator species[J]. Haiyang Xuebao, 2000, 22(1): 93—101.
- [11] Ueda H, Yamaguchi A, Saitoh S I, et al. Speciation of two salinity-associated size forms of *Oithona dissimilis* (Copepoda: Cyclopoida) in estuaries[J]. Journal of Natural History, 2011, 45(33/34): 2069—2079.
- [12] Jungbluth M J, Lenz P H. Copepod diversity in a subtropical bay based on a fragment of the mitochondrial COI gene[J]. Journal of Plankton Research, 2013, 35(3): 630—643.
- [13] Cornils A, Wend-Heckmann B, Held C. Global phylogeography of *Oithona similis*, s. l. (Crustacea, Copepoda, Oithonidae) — A cosmopolitan plankton species or a complex of cryptic lineages? [J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2017, 107: 473—485.
- [14] 张武昌, 赵楠, 陶振铎. 中国海浮游桡足类图谱[M]. 北京: 科学出版社, 2010.  
Zhang Wuchang, Zhao Nan, Tao Zhencheng. Marine Planktonic Copepods in China Seas[M]. Beijing: Science Press, 2010.
- [15] Franz H G, Gonzalez S R. The production of *Oithona similis* (Copepoda: Cyclopoida) in the Southern Ocean[J]. ICES Journal of Marine Science, 1995, 52(3/4): 549—555.
- [16] 孙松, 周克, 杨波, 等. 胶州湾浮游动物生态学研究 I. 种类组成[J]. 海洋与湖沼, 2008, 39(1): 1—7.  
Sun Song, Zhou Ke, Yang Bo, et al. Ecology of zooplankton in the Jiaozhou Bay I. species composition[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2008, 39(1): 1—7.
- [17] 毕洪生, 孙松, 高尚武, 等. 渤海浮游动物群落生态特点 I. 种类组成与群落结构[J]. 生态学报, 2000, 20(5): 715—721.  
Bi Hongsheng, Sun Song, Gao Shangwu, et al. The ecological characteristics of the zooplankton community in the Bohai Sea I. species composition and community structure[J]. Acta Ecologica Sinica, 2000, 20(5): 715—721.
- [18] 方文东, 方国洪. 南海南部海洋环流研究的新进展[J]. 地球科学进展, 1998, 13(2): 166—172.  
Fang Wendong, Fang Guohong. The recent progress in the study of the southern South China Sea circulation[J]. Advance in Earth Sciences, 1998, 13(2): 166—172.
- [19] 陈柏云. 南海浮游桡足类的分布[J]. 海洋通报, 1985, 4(4): 47—52.  
Chen Boyun. The distribution of planktonic copepods in the South China Sea[J]. Marine Science Bulletin, 1985, 4(4): 47—52.
- [20] 杜飞雁, 王亮根, 王雪辉, 等. 南沙群岛海域长腹剑水蚤(*Oithona* spp.) 的种类组成、数量分布及其与环境因子的关系[J]. 海洋与湖沼, 2016, 47(6): 1176—1184.  
Du Feiyan, Wang Lianggen, Wang Huehui, et al. Assemblage and abundance of *Oithona* and environmental factors in NanSha islands waters, South China Sea[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2016, 47(6): 1176—1184.
- [21] 孙柔鑫, 王彦国, 连光山, 等. 海南岛西北沿岸海域浮游桡足类的分布及群落特征[J]. 生物多样性, 2014, 22(3): 320—328.  
Sun Rouxin, Wang Yanguo, Lian Guangshan, et al. Distribution and community characteristics of planktonic copepods in the northwest coastal waters off Hainan island[J]. Biodiversity Science, 2014, 22(3): 320—328.

- [22] 李纯厚, 贾晓平, 蔡文贵. 南海北部浮游动物多样性研究[J]. 中国水产科学, 2004, 11(2): 139—146.  
Li Chunhou, Jia Xiaoping, Cai Wengui. Diversity of marine zooplankton in the north of South China Sea[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2004, 11(2): 139—146.
- [23] Wang Lianggen, Du Feiyan, Wang Xuehui, et al. Distribution and role of the genus *Oithona*, (Copepoda: Cyclopoida) in the South China Sea[J]. Oceanologia, 2017, 59(3): 300—310.
- [24] Machida R J, Miya M U, Nishida M, et al. Large-scale gene rearrangements in the mitochondrial genomes of two calanoid copepods *Eucalanus bungii* and *Neocalanus cristatus* (Crustacea), with notes on new versatile primers for the srRNA and COI genes[J]. Gene, 2004, 332(22): 71—78.
- [25] Fujisawa T, Barraclough T G. Delimiting species using single-locus data and the Generalized Mixed Yule Coalescent approach: a revised method and evaluation on simulated data sets[J]. Systematic Biology, 2013, 62(5): 707—724.
- [26] Puillandre N, Lambert A, Brouillet S, et al. ABGD, Automatic Barcode gap discovery for primary species delimitation[J]. Molecular Ecology, 2012, 21(8): 1864—1877.
- [27] Drummond A J, Suchard M A, Xie D, et al. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1. 7[J]. Molecular Biology and Evolution, 2012, 29(8): 1969—1973.
- [28] Huelsenbeck J P, Ronquist F, Nielsen R, et al. Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology[J]. Science, 2001, 294(5550): 2310—2314.
- [29] Irestedt M, Fjeldså J, Nylander J A A, et al. Phylogenetic relationships of typical antbirds (Thamnophilidae) and test of incongruence based on Bayes factors[J]. BMC Evolutionary Biology, 2004, 4(1): 23.
- [30] Akaike H. A new look at the statistical model identification[J]. IEEE Transactions on Automatic Control, 1974, 19(6): 716—723.
- [31] Akaike H. Factor analysis and AIC[J]. Psychometrika, 1987, 52(3): 317—332.
- [32] Posada D, Crandall K A. Selecting the best-fit model of nucleotide substitution[J]. Systematic Biology, 2001, 50(4): 580—601.
- [33] Huelsenbeck J P, Ronquist F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees[J]. Bioinformatics, 2001, 17(8): 754—755.
- [34] Guindon S, Dufayard J F, Lefort V, et al. New algorithms and methods to estimate Maximum-Likelihood phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0[J]. Systematic Biology, 2010, 59(3): 307—321.
- [35] Lanave C, Preparata G, Saccone C, et al. A new method for calculating evolutionary substitution rates[J]. Journal of Molecular Evolution, 1984, 20(1): 86—93.
- [36] Hebert P D N, Cywinska A, Ball S L, et al. Biological identification through DNA barcodes[J]. Proceedings of the Royal Society Biological Sciences, 2003, 270(1512): 313—321.
- [37] 孙栋, 王春生. 深远海浮游动物生态学研究进展[J]. 生态学报, 2017, 37(10): 3219—3231.  
Sun Dong, Wang Chunsheng. A review of open ocean zooplankton ecology[J]. Acta Ecologica Sinica, 2017, 37(10): 3219—3231.
- [38] Bucklin A, Frost B, Bradford-Grieve J, et al. Molecular systematic and phylogenetic assessment of 34 calanoid copepod species of the Calanidae and Clausocalanidae[J]. Marine Biology, 2003, 142(2): 333—343.
- [39] 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(S1): 96—99.
- [40] Costa F O, DeWaard 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.
- [41] Baek S Y, Jang K H, Choi E H, et al. DNA Barcoding of Metazoan Zooplankton Copepods from South Korea[J]. PLoS One, 2016, 11(7): e0157307.
- [42] Ferrari F D, Orsi J. *Oithona davisae*, new species, and *limnoithona sinensis* (burckhardt, 1912) (copepoda: oithonidae) from the sacramento-san joaquin estuary, california[J]. Journal of Crustacean Biology, 1984, 4(1): 106—126.
- [43] 刘镇盛, 杜明敏, 章菁. 国际海洋浮游动物研究进展[J]. 海洋学报, 2013, 35(4): 1—10.  
Liu Zhensheng, Du Mingmin, Zhang Jing. International research advances in marine zooplankton[J]. Haiyang Xuebao, 2013, 35(4): 1—10.
- [44] 王敏晓. 分子标记在中国近海浮游桡足类研究中的应用[D]. 北京: 中国科学院海洋研究所, 2010.  
Wang Minxiao. Application of molecular markers to the researches on pelagic Copepods in the Chinese coastal regions[D]. Beijing: Institute of Oceanology, China Academy of Sciences, 2010.
- [45] 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.
- [46] 中国科学院南海海洋研究所. 海洋科学集刊[M]. 北京: 科学出版社, 1984.  
South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences. Studia Marina Sinica[M]. Beijing: Science Press, 1984.
- [47] Cepeda G D, Blanco-Bercial L, Bucklin A, et al. Molecular systematic of three species of *Oithona* (Copepoda, Cyclopoida) from the Atlantic Ocean: comparative analysis using 28S rDNA[J]. PLoS One, 2012, 7(4): e35861.

# Molecular Phylogenetic of *Oithona* based on COI sequence

Wang Xingxia<sup>1,2</sup>, Xu Lei<sup>1,3,4</sup>, Wang Lianggen<sup>1,3,4</sup>, Chen Xiao<sup>5</sup>, Zheng Yuanyuan<sup>1,6</sup>,  
Wang Xuehui<sup>1,3,4</sup>, Du Feiyan<sup>1,3,4</sup>

(1.South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China; 2.College of Marine Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 3.Guangdong Provincial Key Laboratory of Fishery Ecology and Environment, Guangzhou 510300, China; 4. Key Laboratory of South China Sea Fishery Resources Exploitation & Utilization, Ministry of Agriculture, Guangzhou 510300, China; 5.College of Marine Sciences, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 6.Department of Biology, College of Science, Shantou University, Shantou 515063, China)

**Abstract:** The genus *Oithona* is one of small size cyclopoid copepods which widely distributed and occurs in all kinds of marine environments (estuarine, coastal and oceanic waters). However, routine identification of the species has remained challenging due to the small body size and subtle morphological differences among them. We started with a survey of species diversity in the genus *Oithona* in the South China Sea using a morphological approach, then obtained sequences from mitochondrial COI gene from several individuals of different species, performed tests on DNA taxonomy (ABGD and GMYC) and built a phylogenetic tree with the same gene sequence data download from DNA database. The results of delimitation using ABGD and GMYC model were consistent with morphological approach. The genetic distance within species was 0.0%—1.6% while 17.7%—44.5% between species. Both Bayes and Maximum Likelihood phylogenetic tree showed that each species was clustered together as a monophyletic group. *O.simplex* first separated from others species indicated pioneer speciation in *Oithona*. Two cryptic species were found in *O.similis* and *O.plumifera*, which were from the South China Sea and Mediterranean, Korea Strait and North Sea, respectively the genetic distance reached to 18.6% and 22.9%.

**Key words:** Phylogenetic; *Oithona*; COI gene; DNA taxonomy