

应用物种 DNA 条形码识别太湖流域部分底栖无脊椎动物种类

张翔^{1,2,3}, 张效伟^{1*}, 杨江华¹, 周国栋^{2,3}

(1. 南京大学环境学院, 江苏 南京 210000; 2. 江苏省环境保护水环境生物监测重点实验室, 江苏 常州 213001; 3. 常州市环境监测中心, 江苏 常州 213001)

摘 要:将物种 DNA 条形码实际应用于太湖流域底栖无脊椎动物分类, 并与形态学分类结果比对, 结果表明, DNA 条形码技术可应用于本流域底栖无脊椎动物分类, 但现阶段无法替代形态学鉴定, 主要原因是太湖流域底栖无脊椎动物的绝大多数物种 CO I 基因特征序列是未知的或是 BLAST 所拥有的分类程度不够, 提出在今后的研究中探索建立太湖流域底栖无脊椎动物 CO I 基因数据库。

关键词:太湖流域; 底栖无脊椎动物; DNA 条形码; 形态学分类

中图分类号: X835 文献标志码: B 文章编号: 1674 - 6732 (2016) 06 - 0018 - 04

Applying DNA Barcoding for Identification of Some Invertebrate Macrozoobenthos at Taihu Lake Basin

ZHANG Xiang^{1,2,3}, ZHANG Xiao-wei^{1*}, YANG Jiang-hua¹, ZHOU Guo-dong^{2,3}

(1. School of Environment, Nanjing University, Nanjing, Jiangsu 210000, China; 2. Jiangsu Environmental Protection Key Laboratory for Aquatic Biomonitoring, Changzhou, Jiangsu 213001, China; 3. Changzhou Environmental Monitoring Center, Changzhou, Jiangsu 213001, China)

Abstract: DNA barcoding was applied for identification of invertebrate macrozoobenthos at Taihu Lake basin and the results were compared with those obtained from morphological classification. The results demonstrated that DNA barcoding could be applied to classify invertebrate macrozoobenthos at the basin, but at this stage could not replace morphological classification. The main reason was that there were unknown COI characteristic gene sequences for most of the invertebrate macrozoobenthos species or that the degree of classification was not enough for BLAST. It was proposed to explore and establish the gene data bank for invertebrate macrozoobenthos at Taihu Lake basin in future studies.

Key words: Taihu Lake basin; Invertebrate macrozoobenthos; DNA barcoding; Morphological classification

底栖无脊椎动物作为常用的水质指示生物之一^[1], 近年来因传统形态学分类鉴定的局限性和传统分类学家队伍的缩减^[2], 使得其用作水质生物生态监测与评价的推广有所难度。2009 年, 第 57 届北美底栖生物学协会 (NABS) 年度会议中小结了 DNA 条形码技术对底栖生物研究的贡献, 并在底栖生物科学家之中进行推广, 让此技术在工作中得到大面积的使用^[3]。在我国, 目前该技术以植物、昆虫和水生动物的研究为主流^[4], 在水生动物研究中, 尤以海洋动物为主^[5]。在淡水底栖无脊椎动物方面, 除水生昆虫外, 国内研究报道较少, 但甲壳动物和软体动物均有所涉及; 2006 年杨学明等^[6]对罗氏沼虾 3 个群体线粒体 CO I 基因的序

列差异和遗传标记进行研究报道; 2007 年关飞等^[7]对中国不同种拟钉螺 CO I 基因的序列差异及其系统学进行研究报道; 2008 年黄晓燕等^[8]对 5 种螺蛳属动物和中国圆田螺 CO I 基因序列进行研究报道; 2012 年焦明超^[9]对环棱螺属部分种类 DNA 条形码及其系统发育进行研究报道; 2015 年欧阳解秀等^[10]应用 DNA 条形码技术对鄱阳湖和赣江的中国淡水蚌类进行研究报道。

收稿日期: 2016 - 03 - 17; 修订日期: 2016 - 03 - 25
基金项目: 国家水体污染控制与治理科技重大专项基金资助项目 (2012ZX07506 - 003)
作者简介: 张翔 (1985—), 男, 工程师, 本科, 从事水生生物学监测工作。
*通讯作者: 张效伟 E-mail: zhangxw@nju.edu.cn

现尝试选取太湖流域最具代表性的底栖无脊椎动物,使用 DNA 条形码技术分析 CO I 基因,并与传统形态学鉴定结果比较,探索 DNA 条形码技术应用于本流域底栖无脊椎动物鉴定的可行性和实用性,为推进淡水生物监测方法作出探索。

1 材料与方法

1.1 样品材料

1.1.1 样品采集

按照《水和废水监测分析方法》(第四版)5.1.3 的要求,于 2013 年 8 月—2014 年 5 月在太湖流域采集样品,点位包括太湖流域上游水系的溪流与水库,下游水系的湖荡与河流,共 10 个代表点位,见图 1。

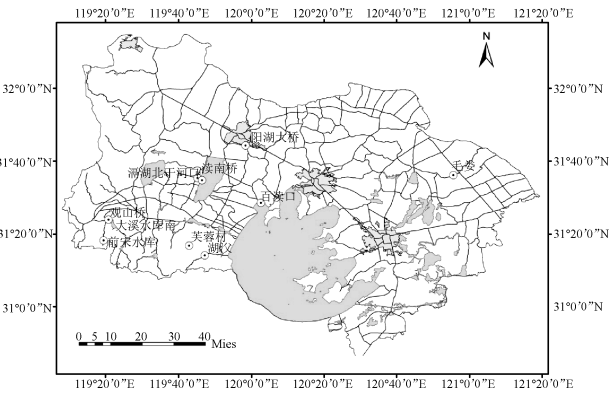


图 1 样品采集点位

1.1.2 样品鉴定和保存

样品采集、挑拣后固定于 80% 乙醇溶液,在实验室进行形态学分类鉴定,鉴定完成后将已鉴定样品置于 99.99% 乙醇溶液保存。

1.2 实验方法

1.2.1 形态学解剖选取

在鉴定后保存的样品中挑选个体完整度高,动物体表无大量杂质的个体,用 Nikon SMZ18 研究级体视显微镜拍照留存图像资料。使用无菌剪、无菌手术刀片获取动物组织:昆虫、甲壳动物取足部,环节动物、软体动物、扁形动物取身体软组织(避开消化道),如个体实在太小(如部分摇蚊幼虫),则选取完整个体,用纯水和 75% 乙醇溶液分别清洗取出的身体组织约 0.005 0 g,保证无杂质、无污染。

1.2.2 DNA 提取

研究使用一种改良的 HotSHOT^[11] 快速方法:

取得的动物组织装入洁净的玻璃十字柄组织研磨器中加入 10 μ L 碱性裂解液 (NaOH 25 mmol/L、EDTA 二钠 0.2 mmol/L, pH 值 = 8.0) 研磨,将研磨所得液体加入 0.2 mL 离心管中,再添加 20 μ L 碱性裂解液。离心管均在 95 $^{\circ}$ C 孵育 30 min,并贮存于冰上 3 ~ 5 min。每根离心管加入 30 μ L Neutralizing Buffer 缓冲液^[12],离心后取上清液。

1.2.3 PCR 扩增与产物电泳

PCR 扩增体系最终体积为 50 μ L,其中包括引物 1 μ L,浓度为 10 μ mol/L,超纯水 37.8 μ L,10 $\times$ PCR High Fidelity PCR buffer 5 μ L,50 mmol/L Mg-SO₄ 2 μ L,10 mmol/L dNTP mix 1 μ L,Platinum Taq DNA 聚合酶 0.2 μ L,DNA 模板 2 μ L。引物见表 1。

表 1 引物

名称	序列(5'-3')	参考文献
mlCOIintF	GGWACWGGWTGAACWGTWTAYCCYCC	[13]
mlCOIintR	GGRGRTASACSGTTCACSCSGTSCC	

将装有样品的 96 孔板置于 SureCycler 8800 热循环仪中进行 PCR 反应,为降低非特异性扩增率,进行了 16 个初始周期如下:95 $^{\circ}$ C 10 s 变性,62 $^{\circ}$ C (每个周期降低 1 $^{\circ}$ C) 30 s 退火,72 $^{\circ}$ C 60 s 延伸,25 个循环退火至 46 $^{\circ}$ C;72 $^{\circ}$ C 10 min 后延伸。实验包含一个不含 DNA 模板的阴性对照。

1.2.4 基因序列测定

为保证每个样品测序均匀,扩增产物在等分子量、等质量浓度 (10 mg/L) 条件下混合。使用 Ion Plus fragment library kit 试剂盒将 100 ng 的扩增产物在 79 μ L 无核酸酶水中进行末端修饰和片段衔接。用 Agencourt AMPure XP kit 试剂盒,纯化末端和衔接片段 DNA、去除引物二聚体和小于 100 bp 的 PCR 产物。纯化后的扩增产物库转移至新的 1.5 mL Eppendorf LoBind 管中,用 Agilent 2100 bioanalyzer 仪器检测其 DNA 浓度和分布区域。

将已定量且大小适中的扩增产物库 (467 bp, 包括扩增引物, MID 标签, Ion Torrent 衔接片段) 连续稀释至终浓度为 26 pmol/L, 用 Ion PGM template OT2 400 kit 试剂盒附加到 ISPs 表面。ISPs 在 Ion OneTouch 富集体系中富集, 使用 Ion PGM sequencing 400 kit 试剂盒、Ion Torrent PGM 试剂盒、“318 v2” 微型芯片测序。本研究测序交由 Life technologies 中国公司于上海完成。

1.2.5 基因序列分析

用 Bio – Linux 8 系统处理所得到的基因序列，去除低质量的末端序列与引物序列，并进行序列组装，将组装完成的序列保存为. fasta 格式；使用 R 语言软件中“Biostrings”软件包和“Bioconductor environment”组件去除少于 150 bp 的片段，同时由于 CO I 基因片段在氨基酸水平上高度保守，故未正确编码氨基酸的非功能性序列也被去除。

在 NCBI(美国国立生物技术信息中心) Gen-Bank 进行在线 BLAST 比对。剔除 BLAST 后比对出的同一样品中序列极少的 DNA 片段。将样品名称、图片资料和 BLAST 后获得的物种比对分析、保存。

2 结果分析

2.1 样品分类

本次实验共选取 13 个底栖无脊椎动物种类，制成 13 × 2 份动物样品，供 CO I 基因提取(表 2)。

表 2 待测序生物种类及数量统计

生物种类	种类	样品数/个	平行样品基因序列/份		
			平行样 1	平行样 2	
节肢动物 <i>Arthropoda</i>	昆虫纲(水生) <i>Insecta</i>	8	8 × 2	15	48
软体动物 <i>Mollusca</i>	双壳纲 <i>Bivalvia</i>	1	1 × 2	3	1
	腹足纲 <i>Gastropoda</i>	2	2 × 2	6	9
环节动物 <i>Annelida</i>	蛭纲 <i>Hirudinea</i>	1	1 × 2	3	4
	寡毛纲 <i>Oligochaeta</i>	1	1 × 2	1	8

2.2 基因组测序及在线 BLAST 结果

使用新一代 DNA 条形码技术测定基因组，共获取 98 条 CO I 基因序列。经过分析软件去除杂带和引物后，剩下的核苷酸片段长度为 15 ~ 2 761 bp。在 13 个物种中均获得基因序列，10 个物种的基因序列为有价值基因序列(表 3)。

表 3 不同物种在线 BLAST 结果

编号	在线 BLAST 结果	比对获得的基因序列长度	GenBank 序号	相似度/%
A84	洞穴丽蚌 <i>Lamprotula caveata</i>	304	KJ434503	100
A10	多巴小摇蚊 <i>Microchironomus tabarui</i>	634	KJ188136	98.65

续表

编号	在线 BLAST 结果	比对获得的基因序列长度	GenBank 序号	相似度/%
A34	摇蚊科一种 <i>Chironomidae sp.</i>	242	JF412070	98.55
A39 ^①	摇蚊科一种 <i>Chironomidae sp.</i>	15	JF412070	98.53
A61 ^①	摇蚊科一种 <i>Chironomidae sp.</i>	68	JF412070	98.16
A20	羽摇蚊 <i>Chironomus plumosus</i>	1 393	KF833366	97.83
A30	多足摇蚊属一种 <i>Polypedilum sp.</i>	693	KJ530921	97.55
A53	白舌蛭 <i>Alboglossiphonia weberi</i>	1 130	AY962453	97.48
A52 ^①	光滑狭口螺 <i>Stenothyra glabra</i>	68	KF966539	97.47
A23	前突摇蚊属一种 <i>Procladius sp.</i>	540	KF408080	96.73
A22	强状二叉摇蚊 <i>Dicrotendipes nervosus</i>	748	JF412131	96.6
A25	寡毛纲一种 <i>Oligochaeta sp.</i>	2 761	KM196601	95.88
A81	铜锈环棱螺 <i>Bellamyia aeruginosa</i>	694	JN621270	95.43

① 比对获得的基因序列长度 < 200 bp，因可信度不高，不进行 DNA 条形码技术与形态学鉴定比对。

2.3 DNA 条形码技术与形态学鉴定比对

研究表明，用 DNA 条形码技术与形态学鉴定均可对同一样品进行分辨，但各有优劣，其中：DNA 条形码技术鉴定样品有 4 个与形态学鉴定样品相同，可修正和细化 4 个形态学鉴定样品，有 1 个分类程度不如形态学鉴定样品，有 1 个样品存疑(表 4)。

表 4 DNA 条形码技术识别与形态学鉴定结果比对

编号	形态学鉴定结果	在线 BLAST 结果	比对情况
A84	背瘤丽蚌 <i>Lamprotula leai</i>	洞穴丽蚌 <i>Lamprotula caveata</i>	形态学鉴定结果需修正
A10	软铗小摇蚊 <i>Microchironomus tener</i>	多巴小摇蚊 <i>Microchironomus tabarui</i>	形态学鉴定结果需修正
A34	螺科一种 <i>Ceratopogonidae sp.</i>	摇蚊科一种 <i>Chironomidae sp.</i>	存疑
A20	羽摇蚊 <i>Chironomus plumosus</i>	羽摇蚊 <i>Chironomus plumosus</i>	一致
A30	多足摇蚊属一种 <i>Polypedilum sp.</i>	多足摇蚊属一种 <i>Polypedilum sp.</i>	一致
A53	扁(舌)蛭科一种 <i>Glossiphoniidae sp.</i>	白舌蛭 <i>Alboglossiphonia weberi</i>	形态学鉴定结果需细化
A23	前突摇蚊属一种 <i>Procladius sp.</i>	前突摇蚊属一种 <i>Procladius sp.</i>	一致

续表			
编号	形态学鉴定结果	在线 BLAST 结果	比对情况
A22	强状二叉摇蚊 <i>Dicortendipes nervosus</i>	强状二叉摇蚊 <i>Dicortendipes nervosus</i>	一致
A25	霍普水丝蚓 <i>Limnodrilus hoffmeisteri</i>	寡毛纲一种 <i>Oligochaeta sp.</i>	DNA 条形码 识别需细化
A81	方形环棱螺 <i>Bellamya quadrata</i>	铜锈环棱螺 <i>Bellamya aeruginosa</i>	形态学鉴定 需修正

(1)复检 A84 号样品,背瘤丽蚌与洞穴丽蚌同属小方蚌亚科 (*Ambleminae*) 丽蚌属 (*Lamprotula*), 且为姐妹种^[14],洞穴丽蚌为我国特有种。在本实验中因 DNA 条形码识别相似度为 100%,故予以更改形态学鉴定结果。形态学鉴定关键为对洞穴丽蚌的洞穴判定:两壳面对应的凹凸,即在一壳为凹,另一壳相应位置为凸。但在实际操作中,因其深、浅情况个体间差异大,故辨识较困难^[15],而使鉴定出现一些偏差;

(2)复检 A10 号样品,软铗小摇蚊与多巴小摇蚊同属于摇蚊亚科 (*Chironominae*) 摇蚊族 (*Chironomini*) 小摇蚊属 (*Microchironomus*),其中多巴小摇蚊 2006 年由闫春财等^[16]于中国首次记录,软铗小摇蚊为世界广布种,在本实验中因 DNA 条形码识别相似度为 98.65%,故予以更改形态学鉴定结果。首先确定 A10 号样品与上传至 NCBI GenBank 的物种样品为同一物种,但复检后发现形态学鉴定关键描述仍存在一定的模糊,并未制作详实的检索表,在今后可予以完善;

(3)复检 A34 号样品,螺科一种与摇蚊科一种两科同属于昆虫纲 (*Insecta*) 双翅目 (*Diptera*),经检索资料^[17]及参考样品查找,形态学鉴定应无错,故此处存疑;

(4)复检 A53 号样品,形态学鉴定的扁(舌)蛭科一种分类程度包含了白舌蛭,但形态学鉴定人员水平所限,DNA 条形码细化了分类程度,查阅相关资料后采纳 DNA 条形码技术提供的细化结果;

(5)复检 A25 号样品,霍普水丝蚓属于寡毛纲一种,DNA 条形码识别因受制于本流域底栖无脊椎动物 CO I 基因库不完善,故分类程度不如形态学鉴定,因此 DNA 条形码识别需细化;

(6)复检 A81 号样品,方形环棱螺与铜锈环棱螺同为环棱螺属 (*Bellamya*),在样品固定后,形态学鉴定仅能依据体螺层的膨胀度来判别,因描述抽

象且鉴定人员水平所限,在实际工作中常有混淆,DNA 条形码在基因层面上提供了识别条件^[9],故采纳 DNA 条形码技术提供的结果。

3 讨论与展望

研究表明 DNA 条形码技术可应用于太湖流域底栖无脊椎动物鉴定。但现阶段无法替代形态学鉴定,主要原因是太湖流域底栖无脊椎动物的绝大多数物种 CO I 基因特征序列是未知的或是 BLAST 所拥有的分类程度不够,故将在今后的研究中探索建立太湖流域底栖无脊椎动物 CO I 基因数据库。

DNA 条形码技术可以鉴定已知物种,识别未知物种,发现目前形态学鉴定物种出现的模糊区域,但不应完全取代形态学鉴定^[18]。因为在实际应用中会遇到一些问题:①对于未知物种只能识别,无法精确鉴定其分类地位;②无法明晰物种存活与否,因为太湖流域生物所受环境变化影响剧烈,物种演替变化较快,使用 DNA 条形码技术鉴定采样点位物种时,会因生物死亡未分解而残留该生物 DNA,使得鉴定数据杂糅,不能很好地支撑生态评估和政策决断;③太湖流域底栖无脊椎动物 CO I 基因数据库尚未建立,且之前所有结果均依赖于形态学鉴定,如何得到精准而有延续的数据也是在将来需要探讨的。因为从实验室到业务工作均要求更准确、实用的数据,所以将来应将形态学鉴定与 DNA 条形码技术互相结合,获得两者印证的结论再予以使用。

[参考文献]

[1] 陈志宁,张红高,周崴,等. 太湖大型底栖动物群落分布和氮磷因子的相关分析[J]. 环境监控与预警,2016,8(1):45-50.

[2] MALLETT J, WILLMOTT K. Taxonomy: renaissance or Tower of Babel? [J]. Trends in Ecology & Evolution, 2003, 18(2): 57-59.

[3] DONALD J B, BERNARD W S. Applying DNA barcoding in benthology: the state of the science[J]. Journal of the North American Benthological Society, 2011, 30(1):122 - 124.

[4] 薛银刚,许霞,蔡焕兴,等. DNA 条形码技术在水生生物分类中的研究进展[J]. 环境监控与预警,2012,4(6):23-26.

[5] 林森杰,王路,郑连明,等. 海洋生物 DNA 条形码研究现状与展望[J]. 海洋学报,2014,36(12):1-17.

(下转第 25 页)

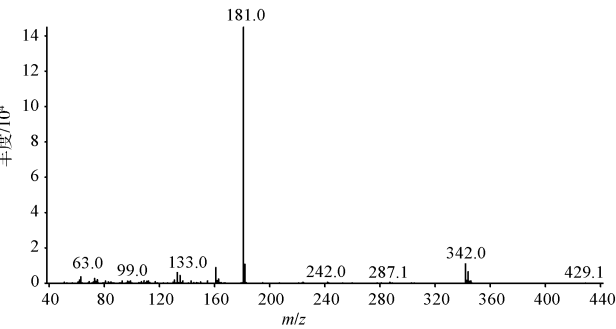


图 4 2,4-二氯酚的五氟苄基溴衍生产物离子碎片图

3 结语

衍生方法可以大大提高酚类物质的色谱行为，文中所述 3 种衍生方法均具有改善峰形、提高检测灵敏度、降低检出限等优势。其中，酰化衍生法衍生试剂具有腐蚀性，会对密封垫和色谱系统有较大的损伤，降低进样垫和色谱柱的使用寿命；硅烷基化衍生产物结构稳定，碎片离子最丰富，但在衍生过程中，对衍生体系的水分非常敏感，水分的存在会大大减低衍生效果，需要确保衍生体系脱水充分；五氟苄基溴衍生产物结构稳定，虽然碎片离子没有硅烷基化衍生产物丰富，但相比其他 2 种方法更成熟和完善。

(上接第 21 页)

[6] 杨学明, 郭亚芬, 陈福艳, 等. 罗氏沼虾 3 个群体线粒体 CO I 基因的序列差异和遗传标记研究[J]. 遗传, 2006, 28 (5): 540-544.

[7] 关飞, 牛安欧, 李友松. 中国不同种拟钉螺 CO I 基因序列差异分析及其系统学初探[J]. 中国人兽共患病学报, 2007, 23(1): 45-47.

[8] 黄晓燕, 王丽珍. 5 种螺蛳属动物和中国圆田螺 CO I 基因序列分析[J]. 水生态学杂志, 2008, 1(5): 106-108.

[9] 焦明超. 环棱螺属部分种类 DNA 条形码研究及其系统发育分析[D]. 南昌: 南昌大学, 2012.

[10] 欧阳解秀, 苏金荟, 欧阳珊, 等. 蚌科 DNA 条形码识别与系统发育分析[J]. 农业生物技术学报, 2015, 23(6): 779-787.

[11] TRUETT G E, HEEGER P, MYNATT R L, et al. Preparation of PCR-quality mouse genomic DNA with hot sodium hydroxide and tris (HotSHOT) [J]. Biotechniques, 2000, 29(1): 52-53.

[12] GOLMAN K. Neutralizing buffer; US, US 4650671 A[P]. 1987.

[参考文献]

[1] 周艳玲. 酚类化合物监测方法研究进展[J]. 环境监测管理和技术, 2011, 23(S1): 70-77.

[2] 李娟, 王荟. 水中多种酚类化合物衍生化方法研究[J]. 环境监控与预警, 2014, 6(5): 23-28.

[3] 胡正良, 陈梅兰, 申屠超, 等. 液液萃取-高效液相色谱测定水中酚类化合物[J]. 分析化学, 2008, 36(9): 6-10.

[4] 杨丽莉, 王美飞, 胡恩宇等. 超声波提取-气相色谱法测定土壤中 21 种酚类化合物[J]. 色谱, 2013, 22(11): 412-419.

[5] 张丽, 李楠, 万延延. 固相萃取-高效液相色谱法测定饮用水中酚类化合物[J]. 环境监测管理和技术, 2010, 15(1): 125-128.

[6] 李娟, 王荟. 水中多种酚类化合物同步提取方法研究[J]. 中国环境监测, 2013, 6(4): 31-35.

[7] NURIA F, MARINA G, ROSA M M, et al. Solid-phase extraction of polar compounds with a hydrophilic copolymeric sorbent [J]. Journal of Chromatography, 2004, 1030(1-2): 63-68

[8] CAI Y Q, JIANG G B, LIU J F, et al. Multi-walled carbon nanotubes packed cartridge for the solid-phase extraction of several phthalate esters from water samples and their determination by high performance liquid chromatography [J]. Analytica Chimica Acta, 2003, 494: 149-156.

[9] RIKARD W, LARS T, SAIIOA Z, et al. Development of a solid-phase extraction method for the determination of polychlorinated biphenyls in water. Journal of Chromatography, 2004, 1033(1): 1-8.

[13] LERAY M, YANG J Y, MEYER C P, et al. A new versatile primer set targeting a short fragment of the mitochondrial CO I region for metabarcoding metazoan diversity: application for characterizing coral reef fish gut contents. Front Zool 10: 34 [J]. Frontiers in Zoology, 2013, 10(1): 34.

[14] 魏开建. 中国蚌科的遗传多样性与系统发育的研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2004.

[15] 浙江动物志编辑委员会. 浙江动物志 软体动物[M]. 杭州: 浙江科学技术出版社, 1991.

[16] YAN C C, WANG X H. Microchironomus Kieffer from China (Diptera: Chironomidae) [J]. Zootaxa, 2006, 1108: 53-68.

[17] JOHN C M, YANG L F, TIAN L X. Aquatic insects of China useful for monitoring water quality[M]. Nanjing: Hohai University Press, 1994.

[18] EBACH M C, HOLDREGE C. DNA barcoding is no substitute for taxonomy[J]. Nature, 2005, 434(7034): 697.

栏目编辑 周立平