

6种蟹类 DNA 条形码鉴定技术研究

王娜冷, 胡则辉, 卞光明, 王跃斌, 胡成硕, 柴学军*

(浙江海洋大学海洋与渔业研究所, 浙江省海洋水产研究所, 浙江舟山 316021)

摘要 [目的]研究蟹类 DNA 条形码技术。[方法]利用 PCR 技术对浙江沿海 6 种常见蟹类($n=34$) mtDNA *COI* 基因进行扩增, 最终获得 688 bp 基因片段。[结果]7 个红星梭子蟹(*Portunus sanguinolentus*)样品中检测到 5 个单倍型, 5 个锐齿蛄(*Charybdis acuta*)样品中检测到 5 个单倍型, 锈斑蛄(*C. feriatius*)、日本蛄(*C. japonica*)、绵蟹(*Dromia dehaani*)、三疣梭子蟹(*P. trituberculatus*)样品中检测到单倍型数分别为 3、2、1; 6 种蟹类 *COI* 基因 T、C、A、G 的平均含量分别为 25.3%、18.2%、36.2% 和 20.3%, A+T 含量为 58.5%~64.1%; 种内变异较小, 遗传距离处于 0.000~0.004, 种间遗传距离为 0.143~0.235; 使用最大似然法构建的分子进化树揭示相同物种个体首先聚类, 不存在不同物种个体交叉聚类。[结论]*COI-L1490/H2198* 通用引物在蟹类条形码研究中具有普遍适用性, mtDNA *COI* 基因能够作为 6 种蟹类有效鉴别的 DNA 条形码, 且区分度高、支持形态学分类结果。

关键词 蟹类; DNA 条形码; *COI* 基因

中图分类号 S188+.1; Q75 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2017)26-0131-02

Identification Technology Research on DNA Barcode of Six Crabs Species

WANG Na-ling, HU Ze-hui, BIAN Guang-ming, CHAI Xue-jun* et al (Marine and Fisheries Research Institute of Zhejiang Ocean University, Zhejiang Marine Fisheries Institute, Zhoushan, Zhejiang 316021)

Abstract [Objective] To study DNA barcode of crab. [Method] PCR technique was used to amplify the mtDNA *COI* gene in six crabs species collected from Zhejiang coastal sea, obtaining 688 bp gene fragment. [Result] Seven individuals of *Portunus sanguinolentus* were tested for five haplotypes, five haplotypes were detected in five *C. acuta* samples, and the haplotypes of *C. feriatius*, *C. japonica*, *D. dehaani*, *P. trituberculatus* were 3, 2, 2 and 1. The average content of 6 species of *COI* gene T, C, A and G of crabs was 25.3%, 18.2%, 36.2% and 20.3%, A + T was 58.5% - 64.1%. The variation of the species was just a little, the genetic distance was 0.000 - 0.004, the range of genetic distance was 0.149 - 0.241. Phylogenetic tree using maximum likelihood method revealed that the same species of species firstly cluster, and there was no individual cross-clustering of individual species. [Conclusion] The analysis indicated that the primer pair of *COI-L1490/H2198* for crabs had universal applicability in the barcode study. mtDNA *COI* gene could be used as a DNA barcode of 6 crabs, with higher distinguish degree supporting the morphological classification.

Key words Crabs; DNA barcode; *COI* gene

浙江海域蟹类资源十分丰富, 自 20 世纪 70 年代后期以来, 捕捞强度剧增, 致使浙江沿海传统的底层鱼类资源衰退, 捕食虾蟹类的鱼类减少, 使虾蟹类生存空间扩大, 资源发生量增多, 数量增长较快^[1]。快速、精准鉴定各种蟹类, 对于物种保护、蟹类资源高效利用具有重要意义。然而, 海洋生物形态鉴定方法具有较大局限性, 易受物种性别和发育阶段的限制, 物种表型可塑性以及遗传多样性都会使其无法精准识别物种^[2]。

DNA 条形码(DNA barcode)是一段能够快速、准确鉴别物种的标准 DNA 序列^[3]。DNA 条形码技术对样品要求低、克服表型类似影响、检测自动化、管理数据化、鉴别规模化, 与传统的分类方法相互佐证, 能够实现物种的高效、精准鉴定。Raupach 等^[4]研究分析北海甲壳类动物高效识别系统, 发现 DNA 条形码技术在北海甲壳类动物的识别中具有高效性。Radulovici 等^[5]对圣劳伦斯河河口和海湾的 460 种海洋甲壳类($n=507$)进行 *COI* 分析, 结果显示种间差异比种内差异高 25 倍, 95% 的个体序列差异和形态相一致, 证实了 DNA 条形码技术在海洋甲壳类物种鉴定中的有效性。目前, 蟹类 mtDNA *COI* 基因条形码研究主要见于青蟹属(*Scylla* spp)^[6-7]、华溪蟹属(*Sinopotamon* spp)^[8-9]、蛄属(*Charybdis*

spp)^[10]。

该研究通过 PCR 技术对浙江沿海 6 种常见蟹类($n=34$) mtDNA *COI* 基因进行扩增, 获得相应 DNA 条形码, 以期海洋生态学、海洋分类学和海洋生物分子系统学研究提供基础数据与资料, 为浙江沿海蟹类种质资源的保护与合理开发利用以及海关检测等领域提供科学的理论依据和技术参考。

1 材料与方法

1.1 材料 该试验所用蟹类取自浙江沿海, 置于实验室超低温冰箱(-20℃)保存备用, 具体采集信息见表 1。

表 1 采样情况

Table 1 Information of sampling

种类 Species	采集时间 Gathering time	采集地点 Gathering site	样品数 Sample number	编号 Number
日本蛄 <i>Charybdis japonica</i>	2016-11	温台渔场	9	Cj1~9
锈斑蛄 <i>C. feriatius</i>	2016-11	舟山渔场	4	Cf1~4
锐齿蛄 <i>C. acuta</i>	2016-11	渔山渔场	6	Ca1~6
红星梭子蟹 <i>Portunus sanguinolentus</i>	2016-11	舟山渔场	7	Ps1~7
三疣梭子蟹 <i>P. trituberculatus</i>	2016-12	温台渔场	4	Pt1~4
绵蟹 <i>Dromia dehaani</i>	2016-11	舟山渔场	4	Dd1~4

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取。采用天根海洋动物基因组提取试剂盒(TIANamp Marine Animals DNA Kit)操作说明提取样品总基因组 DNA, 经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测其完整性

基金项目 舟山市公益类科技项目(2015C31013)。**作者简介** 王娜冷(1992—), 女, 重庆人, 硕士研究生, 研究方向: 种质与种苗工程。*通讯作者, 教授级高级工程师, 从事鱼类繁育与海洋生物技术研究。**收稿日期** 2017-07-19

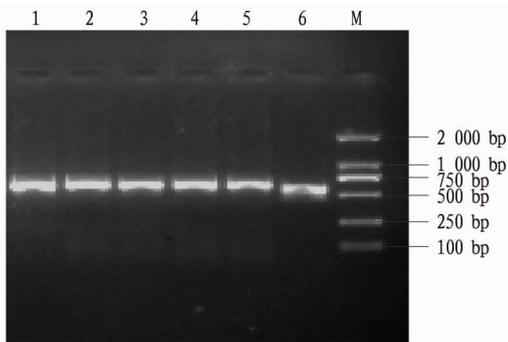
后,用 Nanodrop 2000 紫外分光光度计检测 DNA 质量与浓度,并稀释为 50 ng/ μ L,置于 -20 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.2 PCR 扩增及测序。PCR 采用通用引物 *COI*-L1490: 5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3' 和 *COI*-H2198: 5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3' (上海生工合成),反应体系为 25 μ L,包含 2 \times *Taq* MasterMix (康维世纪) 12.5 μ L,模板 DNA 100 ng,10 μ mol/L 的引物各 1 μ L, ddH₂O 补足至 25 μ L。PCR 反应条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s,49 $^{\circ}$ C 退火 1 min,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,共 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测验证条带的大小后,送往上海杰李生物技术有限公司测序。

1.3 数据分析 采用 BioEdit^[11] 对所得序列进行编辑,用 MEGA 5.0 软件^[12] 分析序列碱基组成,并使用 Kimura 2-parameter 模型计算各蟹类遗传距离,利用最大似然法 (Maximum Likelihood, ML) 构建分子发育进化树,并采用 Bootstrap 1000 检验系统树各分支的置信度。

2 结果与分析

2.1 PCR 琼脂糖凝胶电泳结果 PCR 扩增产物凝胶电泳结果见图 1。产物片段大小与设计的目的片段长度相符 (688 bp),条带明亮、清晰、无杂带,满足测序要求。



注: M—分子量标准(2 000 bp); 1~6 分别为日本蟳、锈斑蟳、锐齿蟳、红星梭子蟹、三疣梭子蟹、绵蟹

Note: M—Maker 2 000 bp; 1—*C. japonica*; 2—*C. feriatius*; 3—*C. acuta*; 4—*P. sanguinolentus*; 5—*P. trituberculatus*; 6—*D. dehaani*

图 1 PCR 产物电泳图谱

Fig. 1 Electrophoresis results of PCR product

2.2 序列分析 采用 BioEdit 对测序所得序列进行编辑,去除序列两端不稳定部分,并通过 Blast 分析比较,确认得到 688 bp 的 *COI* 基因片段。7 个 *P. sanguinolentus* 样品中检测出 5 个单倍型 (*Ps*1~5), 5 个 *C. acuta* 样品检测到 5 个单倍型 (*Ca*1~5), 4 个 *C. feriatius* 样品中检测到 3 个单倍型 (*Cf*1~3)、*C. japonica*、*D. dehaani*、*P. trituberculatus* 检测出单倍型 (*Cj*1~2、*Dd*1~2、*Pt*) 数依次为 2、2、1。

通过 MEGA 5.0 软件计算 6 种蟹类 *COI* 序列的碱基组成 (表 2), T、C、A、G 的平均含量分别为 25.3%、18.2%、36.2% 和 20.3%, A+T 的平均含量为 61.5%。6 种蟹类 *COI* 基因 A+T 含量为 58.9%~64.1%, 明显高于 G+C 含量,与甲壳类等无脊椎动物 *COI* 基因片段结构相似,具有后生动物线粒体基因 AT 偏倚性^[13-14]。

表 2 *COI* 基因碱基组成比较

Table 2 Comparison analysis of the nucleotide composition for *COI* gene

物种 Species	核苷酸组成 Nucleotide composition				A+T 含量 A+T content
	T	C	A	G	%
日本蟳 <i>C. japonica</i>	26.7	18.0	37.2	18.1	63.9
锈斑蟳 <i>C. feriatius</i>	26.0	17.6	38.0	18.4	64.0
锐齿蟳 <i>C. acuta</i>	25.1	19.1	35.3	20.5	60.4
红星梭子蟹 <i>P. sanguinolentus</i>	23.0	18.9	35.9	22.1	58.9
三疣梭子蟹 <i>P. trituberculatus</i>	26.4	16.8	36.9	19.9	63.3
绵蟹 <i>D. dehaani</i>	28.8	15.7	35.3	20.3	64.1
平均 Average	25.3	18.2	36.2	20.3	61.5

2.3 遗传距离 对所获 6 种蟹类 *COI* 序列进行遗传距离分析,由表 3 可知,6 种蟹类种内变异较小,遗传距离处于 0.000~0.004,平均值为 0.003;种间遗传距离为 0.143~0.235,平均值为 0.192,其中 *P. sanguinolentus* 与 *C. acuta* 种间遗传距离最高 (0.235), *C. japonica* 与 *C. feriatius* 遗传距离最低 (0.143)。

2.4 系统进化关系 利用最大似然法构建 6 种蟹类分子进化树 (图 2),支上数值为 1 000 次重复抽样检验置信度,如拓扑图所示,同一物种首先聚类,分子树分为 3 个类群, *C. japonica*、*C. feriatius* 和 *C. acuta* 首先聚为 1 支, *P. sanguinolentus*、*P. trituberculatus* 聚为 1 支, *D. dehaani* 独立为 1 支。

表 3 种内和种间遗传距离差异

Table 3 Within and between species variation in genetic distance

种类 Species	日本蟳 <i>C. japonica</i>	锈斑蟳 <i>C. feriatius</i>	锐齿蟳 <i>C. acuta</i>	红星梭子蟹 <i>P. sanguinolentus</i>	三疣梭子蟹 <i>P. trituberculatus</i>	绵蟹 <i>D. dehaani</i>
日本蟳 <i>C. japonica</i>	0.001					
锈斑蟳 <i>C. feriatius</i>	0.143	0.003				
锐齿蟳 <i>C. acuta</i>	0.165	0.182	0.004			
红星梭子蟹 <i>P. sanguinolentus</i>	0.215	0.203	0.235	0.004		
三疣梭子蟹 <i>P. trituberculatus</i>	0.196	0.176	0.183	0.196	0.000	
绵蟹 <i>D. dehaani</i>	0.195	0.195	0.212	0.220	0.196	0.003

3 讨论

Hebert 等^[15] 提出,种内遗传距离很少大于 2%, 大部分种内遗传距离小于 1%, 种间遗传距离大于种内遗传距离是利用 *COI* 序列有效鉴别物种关键。该研究中 6 种蟹类种内

遗传距离处于 0.000~0.004, 平均值为 0.003; 种间遗传距离为 0.143~0.235, 平均值为 0.192, 种间平均遗传距离是种内的 64 倍, 满足 Hebert 等^[15] 推荐的 10 倍种内变异作为标记物 (下转第 135 页)

渠、田边种植香根草、苏丹草等多年生植物,从距 3~5 m,诱杀螟虫。⑤利用天敌控害。田埂种植大豆、芝麻等显花植物,田间插花种植茭白,为天敌提供食料、替代寄主和庇护场所,保护培育天敌,提高天敌控害能力。有条件的地方(如示范区),于二化螟、稻纵卷叶螟始盛期释放稻螟赤眼蜂,每代放蜂 2~3 次,间隔 3~5 d,每次放蜂 15 万头/hm²。每公顷均匀放置 75~300 个点,放蜂高度以分蘖期蜂卡高于植株顶端 5~20 cm、穗期低于植株顶端 5~10 cm 为宜。⑥采用生物农药防治病虫害。选用苏云金杆菌(Bt)等微生物杀虫剂防治二化螟,使用时间要比化学农药提前 2~3 d。

2.7 推进专业化统防统治 利用专业化防治组织防治病虫害是今后病虫害防治的方向,应不断创造条件,建立一支具有实力和科技水平的专业化病虫害防治队伍,利用高效植保器

械,如自走式喷杆喷雾机、有人直升机、无人植保机和机动喷雾机等,解决目前农户单独防治中存在的各种问题,不断提高二化螟等病虫害的防治效力和水平。

参考文献

- [1] 傅金根,龚秋生,钟新生. 2003 年分宜县水稻“三虫”重发原因分析及防治对策[J]. 江西植保,2004,27(1):13-15.
- [2] 诸茂龙,陈旻,陈享康,等. 单双季稻混栽地区第三代螟虫的发生特点及防治研究[C]//水稻螟虫灾变规律及治理对策研讨会论文集. 北京:中国农业技术推广协会,2001.
- [3] 陈克松,方学县,汪恩国,等. 单双季稻混栽区二化螟种群演变规律与成因分析[J]. 浙江农业科学,2007,1(4):465-467.
- [4] 唐涛,符伟,王培,等. 不同类型杀虫剂对水稻二化螟及稻纵卷叶螟的田间防治效果评价[J]. 植物保护,2016,42(3):222-228.
- [5] 吴丽岩. 寒地稻区二化螟发生规律、测报方法及防治策略的研究[D]. 大庆:黑龙江八一农垦大学,2009.
- [6] 张帅. 2015 年全国农业有害生物抗药性监测结果及科学用药建议[J]. 中国植保导刊,2016(3):61-65.

(上接第 132 页)

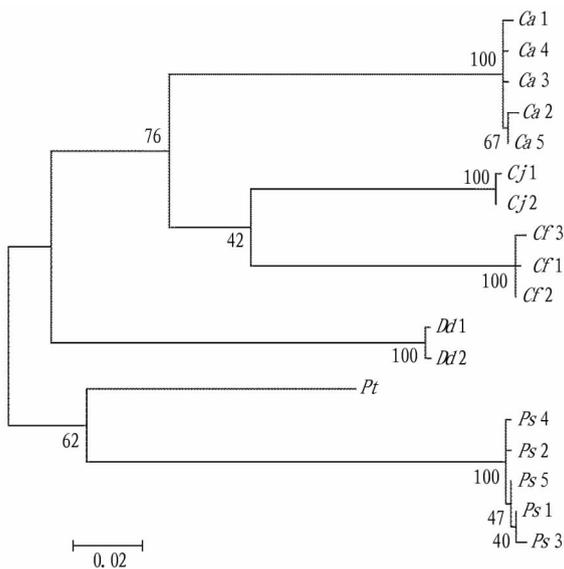


图 2 基于 COI 基因序列构建的 ML 系统进化树

Fig. 2 ML phylogenetic tree based on COI gene sequence

种遗传分化的标准序列阈值;ML 系统进化树显示:相同物种个体首先聚类,不存在不同物种个体交叉聚类,鉴别区分度高,支持形态学分类结果。由此表明,以 mtDNA COI 基因作为 6 个蟹类品种鉴定的 DNA 条形码具有可行性和有效性。此外,基于线粒体 COI 基因 *P. sanguinolentus*、*C. acuta* 的单倍型较高,适用于群体遗传多样性研究。

该研究通过 mtDNA COI 基因通用型引物 COI-L1490/H2198 成功对 6 种浙江沿海常见蟹类进行 PCR 扩增,表明 COI-L1490/H2198 型引物在蟹类条形码研究中具有普遍适用性。研究结果为浙江沿海蟹类鉴别研究提供一定基础资料,但仅依靠单个或少数几个基因数据的比对,尚不足以准确判断相关海域物种的群体遗传多样性。遗传距离分析结果表明,*P. trituberculatus* 与 *P. sanguinolentus* 同属于 *Portunus*

spp.,但其遗传距离(0.196)高于 *P. trituberculatus* 与 *C. feriatulus* 的遗传距离(0.176)。故而,在研究相关蟹类群体遗传多样性时,应获取更多的序列片段以完善相关蟹类基因组数据。

参考文献

- [1] 薛利建,卢占晖,周永东,等. 浙江桁杆拖虾网渔业现状分析[J]. 渔业信息与战略,2011,26(5):6-8.
- [2] 李琪,邹山梅,郑小东,等. DNA 条形码及其在海洋生物中的应用[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版),2010,40(8):43-47.
- [3] 钱路,安榆林. 物种鉴定的新武器:基因条码[J]. 植物检疫,2009,23(3):42-46.
- [4] RAUPACH M J, KNEBELSBERGER T, LAAKMANN S, et al. DNA barcoding of amphipoda from the North Sea[C]//New frontiers in Monitoring European Biodiversity Conference. Palermo, Italy: [s. n.], 2011.
- [5] RADULOVIC A E, SAINTE-MARIE B, DUFRESEN F. DNA barcoding of marine crustaceans from the Estuary and Gulf of St Lawrence: A regional-scale approach[J]. Molecular ecology resources, 2009,9(S1):181-187.
- [6] 马凌波,张凤英,乔振国,等. 中国东南沿海青蟹线粒体 COI 基因部分序列分析[J]. 水产学报,2006,30(4):463-468.
- [7] 林琪,李少菁,黎中宝,等. 中国东南沿海青蟹属不同种类的 mtDNA COI 基因序列分析及其系统发育[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2008,47(2):268-273.
- [8] 白俊,聂宗恒,朱春潮,等. 秦岭山脉华溪蟹属(*Sinopotamon*)淡水蟹 DNA 条形码[J]. 南昌大学学报(理科版),2016,40(4):372-380.
- [9] 徐武杰,邹节新,白俊,等. 鄱阳湖流域华溪蟹属 DNA 条形码[J]. 南昌大学学报(理科版),2015(4):402-408.
- [10] 杨柯,马春艳,马凌波. 基于 COI 基因序列变异探讨日本鬲遗传多样性[J]. 安徽农业科学,2009,37(25):11895-11896.
- [11] HALL T A. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT[J]. Nucleic acids symposium series, 1999,41:95-98.
- [12] TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, et al. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. Molecular biology evolution, 2011,28(10):2731-2739.
- [13] 胡婧,刘念,黄原. 节肢动物线粒体基因组研究进展与基因顺序分析[J]. 昆虫分类学报,2006,28(2):153-160.
- [14] 郭天慧,孔晓瑜,陈四清,等. 三疣梭子蟹线粒体 DNA 16S rRNA 和 COI 基因片段序列的比较研究[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版),2004,34(1):22-28.
- [15] HEBERT P D N, CYWINSKA A, BALL S L, et al. Biological identification through DNA barcodes[J]. Proceedings of the royal society B biological sciences, 2003,270(1512):313-321.