

中华钩线虫的 DNA 条形码研究及分类意义探讨

孙 静, 黄 勇

(聊城大学 生命科学学院, 山东 聊城 252000)

摘要: 海洋线虫是海洋底栖生物中数量上最丰富的类群, 在海洋生态系统中起着重要的作用。对海洋线虫进行种类鉴定是线虫研究中最重要的工作之一。目前, 海洋线虫的鉴定主要采用形态学的分析方法, 但是这种方法往往费时费力, 对于如此丰富的物种, 急需新的鉴定方法。作者以黄海潮间带自由生活线虫优势种——中华钩线虫 (*Oncholaimus sinensis*) 为例, 在形态学分类的基础上, 将 DNA 条形码技术引入线虫的鉴定中, 探讨了线粒体细胞色素 C 氧化酶第一亚基(mtCOI)基因序列、28S rDNA 序列的 D2D3 区以及 18S rDNA 序列的部分序列作为 DNA 条形码在中华钩线虫中的适用性。结果表明, 18S rDNA 序列可作为该种线虫的 DNA 条形码, 为海洋线虫的 DNA 条形码研究提供了很好的借鉴。目前, 利用 DNA 条形码技术对海洋线虫进行鉴定的报道在国内还属空白, 本研究将是海洋线虫分类学研究的很好补充。同时, 对于了解该海域海洋线虫多样性及群落分布格局, 开展海洋环境监测, 进而对海洋的底质环境状况进行健康评价具有十分重要的科学意义。

关键词: 中华钩线虫(*Oncholaimus sinensis*); 形态鉴定; DNA 条形码

中图分类号: Q7 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2016)09-0039-06

doi: 10.11759/hyxx20150226001

海洋线虫是小型底栖生物的永久性成员。在大多数生境中, 海洋线虫是数量上最丰富的类群, 占后生动物数量的 70%~90%, 在某些生境中可达到 90%以上^[1]。海洋线虫还是海洋环境质量的重要指示者, 可以依据其密度、种类组成、群落结构变化对海洋底栖环境的健康状况进行诊断。国内外已经有越来越多的学者将海洋线虫和其他小型底栖生物作为海洋生态监测评估体系的一个重要指标, 应用于海洋环境监测中^[2-3]。

对海洋线虫进行种类鉴定是线虫研究中最重要的工作之一。目前, 海洋线虫的鉴定主要是采用形态学的分析方法^[4-5]。这种方法以线虫的形态特征和超微结构为基础, 运用显微镜对线虫进行鉴定, 是海洋线虫分类鉴定的基础。但是全球海洋线虫的种类极其丰富, 约有十万种之多, 对于如此丰富的物种, 在进行海洋线虫生物多样性的规模调查研究中, 短时间内进行形态学的鉴定非常困难; 并且海洋线虫的外部形态因发育阶段的不同常发生很大的变化, 给主要依据形态特征来鉴定的经典分类工作带来很大困难, 迫切需要新的研究手段。

DNA 条形码技术是实现快速鉴定的很好选择。DNA 条形码通过一个标准化、较短的基因片段序列变异来鉴定物种, 是近年来生命科学和生物技术领

域进展最迅速的前沿学科之一。该技术是传统物种鉴定的强有力补充, 是分类学中辅助物种鉴定的新技术, 它代表了生物分类学研究的一个新方向, 并为海洋生物的分类和鉴定提供了有力工具^[6-8]等。

本研究探讨了线粒体细胞色素 C 氧化酶第一亚基(mtCOI)基因序列, 28S rDNA 序列的 D2D3 区以及 18S rDNA 序列的部分序列作为 DNA 条形码, 在中华钩线虫中的适用性, 以期为其他海洋线虫的 DNA 条形码研究提供方法借鉴。

1 材料与方 法

1.1 样品的采集和处理

沉积物样品采自山东省烟台市渔人码头(37°30'N, 121°26'E), 在沿岸及潮间带进行采样。用小型生物取样管采集定量样品, 用等量 5%(V/V)的甲醛溶液固定,

收稿日期: 2015-02-26; 修回日期: 2015-04-23

基金项目: 山东省自然科学基金资助项目(ZR2014DM008); 聊城大学博士基金资助项目(3180500)

[Foundation: The Science Foundation of Department of Science and Technology of Shandong Province, No. ZR2014DM008; The Doctoral Program Foundation of Liaocheng University, No. 3180500]

作者简介: 孙静(1981-), 山东聊城人, 讲师, 主要从事海洋生物学研究, E-mail: mythcherry@163.com.; 黄勇, 通信作者, 教授, E-mail: huangy@lccu.edu.cn

用于线虫的形态学鉴定和分子生物学分析。

1.2 线虫分选、制片和形态学鉴定

1.2.1 分选

实验室用 0.1% 虎红染色 24 h, 然后用过滤后的自来水冲洗, 使样品通过 500 μm 和 31 μm 的两层网筛, 对截留在 31 μm 网筛上的沉积物样品, 用比重为 1.15 的 Ludox-TM 溶液转移到离心管中, 搅拌均匀, 以 1 800 r/min 的转速离心 10 min。离心 3 次后, 将所得的上清液再通过 31 μm 的网筛, 过滤掉 Ludox, 然后用蒸馏水把样品转移到培养皿中。向盛有线虫的胚胎培养皿中加入一定量的甘油酒精水混合液(5% : 5% : 90%), 放入干燥箱。两周后, 酒精和水挥发, 甘油渗入虫体, 使线虫身体透明, 便于观察鉴定。

1.2.2 制片

在备好的干净载玻片上, 滴甘油一滴, 挑选直径大小一致的线虫, 转移至甘油中。选取直径与虫体直径大致相同的玻璃珠 3 粒, 均匀放于甘油滴的边

缘, 然后加盖盖玻片, 周边用加拿大树胶封闭, 贴标签后置于干燥箱中, 待树胶干涸后即可观察。

1.2.3 形态学鉴定

在微分干涉显微镜下进行观察和测量, 依据线虫形态结构特征进行鉴定^[5]。

1.3 DNA 条形码分析

1.3.1 DNA 提取

形态学鉴定完毕, 用灭菌的解剖刀移去盖玻片, 将单条线虫分别移至 0.5 mL PCR 管中, PBS 缓冲液洗涤两次, 提取线虫 DNA^[9]。

1.3.2 PCR 扩增及测序

分别选取针对 mtCOI 基因、28S rDNA 的 D2D3 区以及 18S rDNA 的引物进行扩增^[9-11], 引物序列如表一所示。将 PCR 产物进行克隆测序。

1.3.3 构建系统树

从 GenBank 数据库中下载海洋线虫 18S rDNA 序列, 用 Clustal X 软件比对序列, 之后用 Mega 5.05 构建 NJ 树(Bootstrap 设置为 1000)。

表 1 本实验所用引物

Tab. 1 Primers used in this study

引物	扩增区域	序列(5'-3')	来源
JB2	COI 基因	F-ATG TTT TGA TTT TAC CWG CWT TYG GTG T	[10]
JB5GED		R-AGC ACC TAA ACT TAA AAC ATA RTG RAA RTG	
JB3	COI 基因	F-TTT TTT GGG CAT CCT GAG GTT TAT	[10]
JB5		R-AGC ACC TAA ACT TAA AAC ATA ATG AAA ATG	
MN18F	18S rDNA	F-CGCGAATRGCTCATTACAACAGC	[11]
22R		R-GCCTGCTGCCTTCCTTGGA	
D2A	28S rDNA	F-ACAAGTACCGTGAGGGAAAGTTG	[9]
D3B		R-TCGGAAGGAACCAGCTACTA	

2 结果

2.1 形态学鉴定

中华钩线虫(图 1)是中国海洋大学张志南教授于 1983 年发表的中国自由生活海洋线虫研究的第一个新种。雄体长 2 010~2 770 μm , 最大体宽 38~42 μm 。体表光滑无装饰, 具纵向排列的短的体刚毛。头部圆盾, 内唇感觉器乳突状, 外唇感觉器刚毛状, 与 4 条头刚毛排列成一圈, 为 6+10 模式, 长约 6 μm 。口腔较大, 深 24~26 μm , 内具 3 个角质化的齿, 其中左亚腹齿较大, 右亚腹齿和背齿较小。化感器袋形, 7~8 μm 宽, 位于背齿齿尖处。排泄孔位于头端后约 120 μm 处的腹面。神经环位于整个咽的中部; 咽

管圆柱状, 末端稍膨大, 与肠相连, 长约占体长的 16%。尾锥柱状, 末端稍膨大成棒状, 长 90~94 μm , 约为肛部体宽的 3.4~4 倍。尾腺细胞位于肛前身体的后端。

两条交接刺等长, 结构简单, 稍弯曲, 近端头状, 远端尖, 中后部稍膨大, 长约为肛部体宽的 1.2 倍。无引带。具一显著的肛前肉质突起; 尾的中后部腹侧有一肛后乳突, 上有 2 对长约 3 μm 的刚毛。除尾部亚背侧刚毛外, 还有约 11 对长 5~9 μm 的环肛刚毛。

雌体较雄体大, 长 3 380 μm , 最大体宽 46 μm , 尾长 134 μm , 为肛部体宽的 4.8 倍。具一前置, 反折状的卵巢, 雌孔开口于身体的中后部的腹面, 距头端距离约为体长的 67%处。

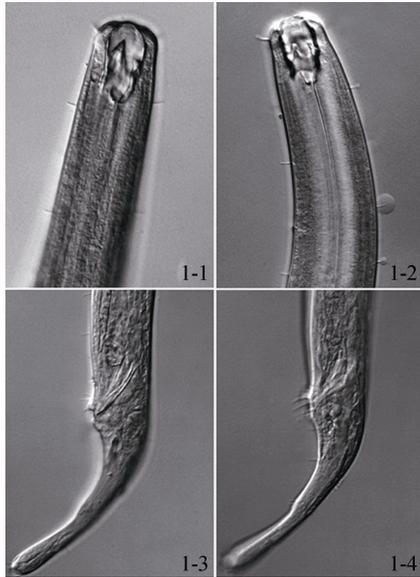


图1 中华钩线虫的显微镜照片

Fig. 1 Light microscopic images of *Oncholaimus sinensis*
 1-1. 雄体前端, 示口腔、大的左亚腹齿和小的背齿; 1-2. 雌体前端, 示头刚毛、口腔、小的右亚腹齿和背齿; 1-3. 雄体尾端, 示交接刺、肛前乳突; 1-4. 雄体尾端, 示环肛刚毛和尾部乳突
 1-1. Lateral view of male head end showing buccal cavity, large left subventral tooth, and small dorsal tooth; 1-2. Lateral view of female head end showing cephalic setae, buccal cavity, small right subventral tooth, and dorsal tooth; 1-3. Lateral view of male tail end showing spicules and preloaeal papillae; 1-4. Lateral view of male tail end showing circumanal setae and tail papillae

该线虫广泛分布于青岛、烟台、威海、日照等海滨潮间带有机质丰富的泥沙质沉积物中, 为个体较大的优势种。

2.2 PCR 产物的琼脂糖电泳检测

中华钩线虫的 COI 基因及 28S rDNA 序列 D2D3 区的 PCR 未得到目的片段(COI 基因扩增产物呈弥散状, 而 28S rDNA 扩增产物有非特异性扩增), 仅 18S rDNA 序列 PCR 取得了比较好的结果, 扩增片段的大小为 345 bp。从图 2 可见, 线虫 DNA 经 PCR 扩增后得到了一条特异性条带(泳道最前端为引物二聚体), 说明该对引物具有较好的特异性。

2.3 序列比对及系统树构建

将测得的序列与 GenBank 数据库中的 *Oncholaimus* sp.(序列号 AY854196)进行比对, 发现序列相似度为 96.2%, 有 13 个碱基的差异(332/345)(图 3)。从系统树可以看出(图 4), 中华钩线虫与 *Oncholaimus* sp. 聚为一支, 通过分析可以确定中华钩线虫的种属关系, 达到鉴定的目的。由此可见, 该 18S rDNA 片段可以作为 DNA 条形码用于鉴定该种线虫。

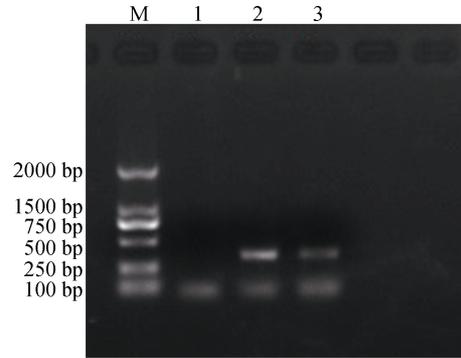


图2 18S rDNA 序列 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳
 Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of 18S rDNA PCR products.
 M. DL2000; 1. 阴性对照; 2,3. *Oncholaimus sinensis*
 M. DL2000; 1. Negative control; 2,3. *Oncholaimus sinensis*

3 讨论

本研究的主要目的是以中华钩线虫为例, 探讨 DNA 条形码技术在海洋线虫鉴定中的应用, 以期为海洋线虫的 DNA 条形码研究提供方法借鉴。

一般来讲, 进行分子生物学方面的研究, 要将海洋线虫进行乙醇固定。虽然这种固定方法便于进行 DNA 提取、PCR 扩增等分析, 但也存在一定的弊端, 线虫的某些表面特征会变得不容易识别, 进而影响形态学鉴定的准确性。所以本研究采用甲醛固定线虫, 便于进行形态学分析, 同时对线虫的 DNA 提取方法进行了改进。甲醛固定线虫的 DNA 提取关键在于裂解时间的控制, 在按照试剂盒 DNeasy Tissue Kit (Qiagen Inc, Crawley, UK)操作的基础上, 将裂解时间延长至 96 h^[9], PCR 模板的量增至 5~15 μL, 可以成功扩增出目的片段。该提取方法对甲醛固定及存档的小型底栖生物标本, 进行分子鉴定和种群遗传分析提供了很好的解决方法。

在本研究中, 中华钩线虫的 COI 基因及 28S rDNA 序列 D2D3 区的 PCR, 经过反应体系及退火温度的优化, 并未扩增出目的片段。以往研究曾指出, 这两个基因作为海洋线虫的 DNA 条形码并不具有较高的适用性。COI 基因的 M1-M6 区常作为 DNA 条形码的标志性基因用于物种鉴定, 但是 Derycke^[10]认为 I3-M11 更适合用作海洋线虫的 DNA 条形码, 两个片段的扩增效率比分别为 87.8%和 65.8%。但是本研究中采用了 Derycke^[10]设计的 JB3(F)、JE5(R)和 JB2(F)、JB5GED(R)两对扩增效率最高的引物, 扩增条带均呈弥散状且无法进行克隆测序。据研究, 28S rDNA 序列 D2D3 区的扩增效率也仅为 62%^[12]和 67%^[13]左

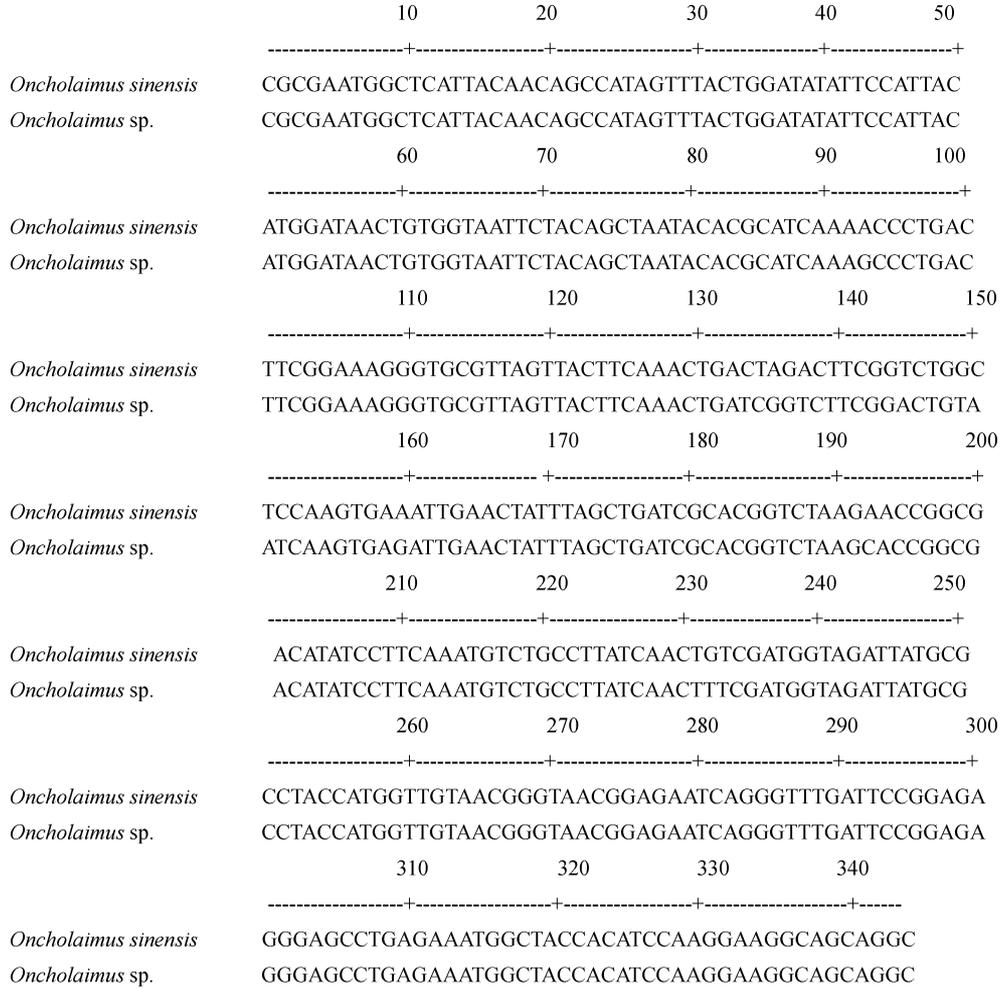


图 3 *Oncholaimus sinensis* 与 *Oncholaimus sp.* 的 18S rDNA 部分序列比对图

Fig. 3 Megalign map of *Oncholaimus sinensis* and *Oncholaimus sp.* based on partial sequences of the 18S rRNA molecule

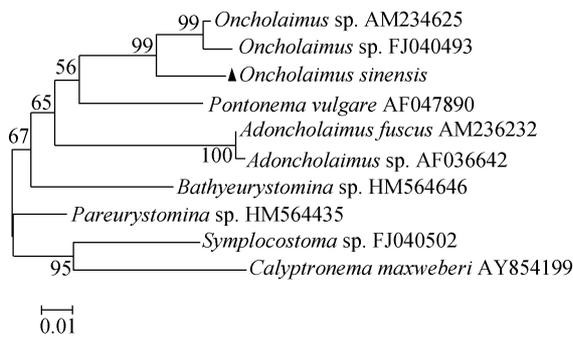


图 4 基于 18S rDNA 部分序列的 NJ 树

Fig. 4 Neighbor-joining tree based on partial sequences of the 18S rRNA molecule

右, 并且该对引物不适用于中华钩线虫(有非特异性扩增)。同时, 经福尔马林固定的样品, 会对线虫的 DNA 造成一定的损坏, 使 DNA 片段化并直接影响 DNA 的提取效率, 这也是本研究未成功获取中华钩线虫的 COI 基因及 28S rDNA 序列 D2D3 区的主要

原因。最终结果表明, 18S rDNA 可以作为有效的条形码对中华钩线虫进行鉴定。该基因包含保守区和高变区, 便于进行引物设计, 并且属于多拷贝基因, 比起单拷贝的基因具有更高的扩增效率^[14]。

因此, 海洋线虫条形码的研究首先要找到一个合适的基因区域或者基因组合; 其次, 要建立一个地理区域范围广泛的序列库, 以便进行海洋线虫多样性和进化关系的分析。高通量测序技术的发展, 推动了越来越多的公共序列数据库(GenBank, EMBL, DDBJ, BOLD 等)的建立, 这其中收录了不少生物的条形码信息, 为海洋线虫的条形码研究提供了序列基础。但是基因区域的选择在海洋线虫的 DNA 条形码研究中一直存在争议。基于以往的研究发现, COI 基因^[10, 15]、28S 序列的 D2D3 区^[13]以及 18S 区序列^[16-17]均被认可作为海洋线虫 DNA 条形码使用, 用于海洋线虫鉴定; 也有的学者建议多个基因片段组合使用

(核基因和线粒体基因)将会取得更好的结果^[15]。

目前国内研究主要是种类调查、种群结构以及监测潮间带有机质污染等方面,并且大多都是基于传统的形态学研究,这就需要大批海洋线虫专家,但效率低下,且数据整合也比较困难。因此,分子生物学的鉴定方法可以对海洋线虫进行高效鉴定和分类^[11, 18-19],进而加速中国海区自由生活线虫分类、区系研究、多样性调查及新种的发掘,为中国海洋生物资源保护提供科学依据。尽管海洋线虫的DNA条形码研究在中国还处于起步阶段,但随着数据库的完善和分析技术的发展,基于DNA条形码的快速、准确、简便的海洋生物多样性监测和现场实时定性、定量分析将成为可能^[20]。新兴的DNA条形码技术将为中国海洋生态系统监测、海洋生物多样性保护以及海洋生态学研究的发展提供强有力的支撑^[21];这将是海洋线虫分类学研究的很好补充,在我国海洋线虫研究中具有广阔的应用前景。

参考文献:

- [1] Higgins R P. Introduction to the study of Meiofauna[M]. Washington, DC: Smithsonian Press, 1988: 19.
- [2] Bongers T, Ferris H. Nematode community structure as a bioindicator in environmental monitoring[J]. Trends in Ecology & Evolution, 1999, 14(6): 224-228.
- [3] Semprucci F, Balsamo M. Free-living marine nematodes as bioindicators: past, present and future perspectives[J]. Environmental Research Journal, 2012, 6(1): 17-35.
- [4] Gerlach S A, Riemann F. The Bremerhaven checklist of aquatic nematodes[M]. Bremerhaven, Veröff: Inst. Meeresforsch. Bremerh, 1973: 1-736.
- [5] Zhang Z N, Platt H M. New species of marine nematodes from Qingdao, China[J]. Bulletin of the British Museum (natural history) Zoology, 1983, 45(5): 253-261.
- [6] Robba L, Russel S J, Barker G L, et al. Assessing the use of the mitochondrial COI marker for use in DNA barcoding of red algae (Rhodophyta)[J]. Am J Bot, 2006, 93: 1101-1108.
- [7] Moura C J, Harris D J, Cunha M R, et al. DNA barcoding reveals cryptic diversity in marine hydroids (Cnidaria, Hydrozoa) from coastal and deep sea environments[J]. Zool Scripta, 2008, 37: 93-108.
- [8] Ward R D, Holmes B H, O' Hara T D. DNA barcoding discriminates echinoderm species[J]. Mol Ecol Resour, 2008, 8: 1202-1211.
- [9] Bhadury P, Austen M C, Bilton D T, et al. Development and evaluation of a DNA barcoding approach for the rapid identification of nematodes[J]. Mar Ecol Prog Ser, 2006, 320: 1-9.
- [10] Derycke S, Vanaverbeke J, Rigaux A, et al. Exploring the use of cytochrome oxidase c subunit 1 (COI) for DNA barcoding of free-living marine nematodes[J]. PLoS ONE, 2010, 5(10): 1-9.
- [11] De Ley P, De Ley I T, Morris K, et al. An integrated approach to fast and informative morphological vouchering of nematodes for applications in molecular barcoding[J]. Phil Trans R Soc B, 2005, 360: 1945-1958.
- [12] Vogt P, Miljutina M, Raupach M J. The application of DNA sequence data for the identification of benthic nematodes from the North Sea[J]. Helgoland Marine Research, 2014, 68(4): 549-558.
- [13] Pereira T J, Fonseca G, Mundo-Ocampo M, et al. Diversity of free-living marine nematodes (Enoplida) from Baja California assessed by integrative taxonomy[J]. Marine Biology, 2010, 157: 1665-1678.
- [14] Floyd R, Abebe E, Papert A, et al. Molecular barcode for soil nematode identification[J]. Mol Ecol, 2002, 11: 839-850.
- [15] Derycke S, Backeljau T, Vlaeminck C, et al. Spatio-temporal analysis of population genetic structure in *Geomonhystera disjuncta* (Nematoda, Monhysteridae) reveals high levels of molecular diversity[J]. Marine Biology, 2007, 151: 1799-1812.
- [16] Bhadury P, Austen M C, Bilton D T, et al. Evaluation of combined morphological and molecular techniques for marine nematode (*Terschellingia* spp.) identification[J]. Marine Biology, 2008, 154: 509-518.
- [17] Bhadury P, Austen M C. Barcoding marine nematodes: an improved set of nematode 18S rRNA primers to overcome eukaryotic co-interference[J]. Hydrobiologia, 2010, 641: 245-251.
- [18] Bhadury P, Austen M C, Bilton D T, et al. Development and evaluation of a DNA-barcoding approach for the rapid identification of nematodes[J]. Marine Ecology Progress Series, 2006a, 320: 1-9.
- [19] Bhadury P, Austen M C, Bilton D T, et al. Molecular detection of marine nematodes from environmental samples: overcoming eukaryotic interference[J]. Aquatic Microbial Ecology, 2006b, 44(1): 97-103.
- [20] Kochzius M, Nolte M, Weber H, et al. DNA microarrays for identifying fishes[J]. Marine Biotechnology, 2008, 10: 207-217.
- [21] Carvalho G, Creer S, Allen M J, et al. Genomics in the discovery and monitoring of marine biodiversity[J]. Introduction to Marine Genomics, 2010, 1: 1-32.

DNA barcoding analysis and taxonomic significance of the marine nematode *Oncholaimus sinensis*

SUN Jing, HUANG Yong

(School of Life Sciences, Liaocheng University, Liaocheng 252000, China)

Received: Feb. 26, 2015

Key words: Marine nematode *Oncholaimus sinensis*; morphological identification; DNA barcoding

Abstract: Marine nematodes are the most dominant and diverse meiofaunal group in marine benthic habitats. They are important to the functioning of estuarine and marine ecosystems. Identification of marine nematodes is one of the most significant aspects in their study. Nematode diagnostics has traditionally relied on detailed morphological examination that requires specialist taxonomic expertise. Given their abundance, morphological taxonomy is time consuming and laborious. The primary purpose of this study was to identify *Oncholaimus sinensis* Zhang & Platt, 1983, using standard taxonomic approaches and DNA barcoding. Here, we describe the identification of *O. sinensis* Zhang & Platt, 1983, using the mitochondrial cytochrome oxidase c subunit (COI) gene, 28S sequences (D2D3 domain), and a short stretch of 18S rRNA sequence. Our results indicated that 18S rRNA sequence may be better suited for DNA barcoding of *O. sinensis*, providing a reference for barcoding marine nematodes. DNA barcodes provide powerful tools for rapid species identification and can be quickly applied in ecological studies on marine nematodes. DNA barcoding analysis of marine nematodes has not yet been reported in China. This study would be a good supplement to identification of marine nematodes. This would be of great significance to the assessment of nematode diversity and regional community distribution, monitoring of marine environment, and status evaluation of marine sediments.

(本文编辑: 谭雪静)