

DNA 条形码在本溪洋湖沟水生昆虫鉴定中的应用

于丹¹, 王剑峰^{1*}, 刘玉双², 王京¹ (1. 沈阳大学生命科学与工程学院/城市有害生物治理与生态安全重点实验室, 辽宁沈阳 110044; 2. 沈阳师范大学古生物学院, 辽宁沈阳 110034)

摘要 [目的]通过调查本溪市洋湖沟水生昆虫的种类, 评价洋湖沟地区太子河源头的水质情况。[方法]2017年7月对洋湖沟水生昆虫进行了采集, 基于 EPT 丰富度、采用 DNA 条形码及形态学特征对洋湖沟所采水生昆虫进行鉴定。[结果]共得到 11 个种 14 条样品序列, 其隶属于 3 目 11 科: 蜉蝣目 3 种, 襀翅目 4 种, 毛翅目 4 种。[结论]鉴定结果显示, 洋湖沟地区 EPT 水生昆虫种类较多, 水质清洁, 达到国家 I 类标准。

关键词 洋湖沟; 水生昆虫; EPT; DNA 条形码; 水质

中图分类号 S186 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2019)11-0056-04

doi:10.3969/j.issn.0517-6611.2019.11.018



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Identificatioin of Aquatic Insects in Yanghugou Based on DNA Barcode

YU Dan¹, WANG Jian-feng¹, LIU Yu-shuang² et al (1. College of Life Science and Engineering/Liaoning Key Laboratory of Urban Integrated Pest Management and Ecological Security, Shenyang University, Shenyang, Liaoning 110044; 2. Paleontological Institute, Shenyang Normal University, Shenyang, Liaoning 110034)

Abstract [Objective] In order to investigate the species of aquatic insects in Yanghugou, Benxi, evaluate the water quality of the source of the Taizi River in Yanghugou area. [Method] Aquatic insects of Yanghugou were collected in July 2017. Based on the EPT richness, DNA barcode method and morphological features, the aquatic insects collected in Yanghugou were identified. [Result] A total of 14 sequences were obtained, totaling 11 species, belonging to 3 orders and 11 families. Among them, there are 3 species of the Ephemeroptera; 4 species of the Plecoptera; and 4 species of the Trichoptera. [Conclusion] The identification results show that there are many aquatic insects in the Yanghugou area, and the water quality is clean. It has reached the national class I standard.

Key words Yanghugou; Aquatic insects; EPT; DNA barcode; Water quality

洋湖沟村位于辽宁省本溪满族自治县与桓仁县交汇处, 属长白山余脉的丘陵地带, 太子河发源于此地, 流经辽阳、鞍山市^[1]。洋湖沟村森林植被茂密, 物种丰富, 至今还保存着原始次生林, 作为源头水, 其地表水质应该达到国家 I 类标准^[2]。

生物评价方法已经成为评价水体质量的一个新方向, 对水体环境质量进行评价的主要方法有指示生物、各种生物指数和多样性指数^[3], 可用于水质监测的水生昆虫指示生物有 100 多种, 其中应用较为广泛的是分析鉴定底栖动物中 3 个敏感性的水生昆虫类群种类, 即蜉蝣目(Ephemeroptera)、襀翅目(Plecoptera)和毛翅目(Trichoptera)的种类(简称 EPT)及数量情况, 利用 EPT 丰富度可快速评价水质优劣^[4]。

三种 EPT 昆虫的成虫和稚虫在形态学存在较大差异, 准确快速的鉴定存在较大困难。DNA 条形码技术自 2003 年提出以来^[5-6], 已被广泛应用于昆虫的分子鉴定^[7-8]。因此, 此次调查旨在结合 DNA 条形码和形态学特征, 鉴别洋湖沟村太子河源头水域中 EPT 水生昆虫种类丰富度, 从而评价洋湖沟地区的水质情况^[1]。

1 材料与方法

1.1 材料 水生昆虫样品, 2017 年 7 月采集于辽宁省本溪县洋湖沟村太子河支流, 采用手抄网的方法进行采集, 标本

于 80% 乙醇中保存。

1.2 DNA 提取、PCR 扩增与测序 根据虫体大小的不同, 采用无损伤冻融法与粉碎法 2 种方法进行虫体总 DNA 的提取。虫体大于 2 cm 采用组织粉碎法(一只足)提取; 虫体小于 2 cm 的采用无损伤冻融法提取。选取 DNA 条形码引物: LCO1490(5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3')和 HCO2198(5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3')^[9]。30 μL 反应体系: ddH₂O 21.25 μL, 10 ×Taq Buffer 3.00 μL, dNTP 2.40 μL, 上、下游引物各 0.60 μL, Taq DNA Polymerase 0.15 μL(5 U/L), DNA 模板 2.00 μL。反应条件: 预变性 94 °C 4 min; 变性 94 °C 30 s, 退火 40~45 °C 1min, 延伸 72 °C 1 min, 进行 40 个循环; 终延伸 72 °C 7 min; 最终保存于 4 °C。取 5 μL PCR 产物, 采用 1% 琼脂糖胶电泳检验扩增效果。将得到的 PCR 产物送至上海生工测序公司, 自带引物进行纯化和双向测序。

1.3 测序结果的分析 用 Chromas 软件观看测序结果是否可用; 用 Seqman 软件对双向测序结果进行拼接, 用 Mega 7.0 软件进行切齐。将切齐后的序列保存成一个 TXT 文本, 采用 ClustalX 1.83 软件对基因序列进行比对分析。将其比对结果转换成 Mega 格式, 最后用 Mega 7.0 软件, 基于 K2P(Kimura-2-Parameter)模型, 构建近邻结合树(Neighbour-Joining Tree, NJ 树)^[10]。

1.4 形态拍照 水生昆虫标本拍照采用 Leica M205C 体视显微镜。

1.5 物种鉴别

1.5.1 DNA 数据库比对: 将拼接得到的碱基序列在 NCBI

基金项目 国家自然科学基金项目(31672332); 辽宁省自然科学基金项目(201602525)。

作者简介 于丹(1995—), 女, 辽宁锦州人, 硕士研究生, 研究方向: 昆虫 DNA 分类。* 通信作者, 副教授, 博士, 从事昆虫分子系统学与形态学研究。

鸣谢 感谢扬州大学霍庆波博士对襀翅目昆虫鉴定提供的帮助。

收稿日期 2019-03-22

(National Center for Biotechnology Information)、EMBL (The European Molecular Biology Laboratory)、DDBJ (DNA Data Bank of Japan)、Bold systems V4 数据库上进行比对,初步确定物种名称。

1.5.1 形态学鉴定。经 DNA 数据库初步比对,同时结合形态学鉴别^[11-18],确定昆虫种类。

2 结果与分析

2.1 测序结果 共提取水生昆虫 30 头(包含相同种),经分子试验,有部分样品 DNA 提取及 PCR 未成功,共送样测序

14 个样品,得到 14 条序列,11 个种。有 12 条序列长度为 658 bp,其余 2 条为 657、659 bp。

2.2 基于 COI 序列构建的 NJ 树 测序结果经过 Blast 比对、构建近邻结合树(NJ 树)如图 1,相似度较高即亲缘关系较近的种聚在一起,证明鉴定结果的准确性。

2.3 物种鉴别 所得序列经比对,有些种类比对结果相似度较低,比对结果及相似度等信息见表 1,并结合形态鉴定,共得水生昆虫 11 种,其中蜉蝣目 3 种,襁翅目 4 种,毛翅目 4 种,见图 2~13。

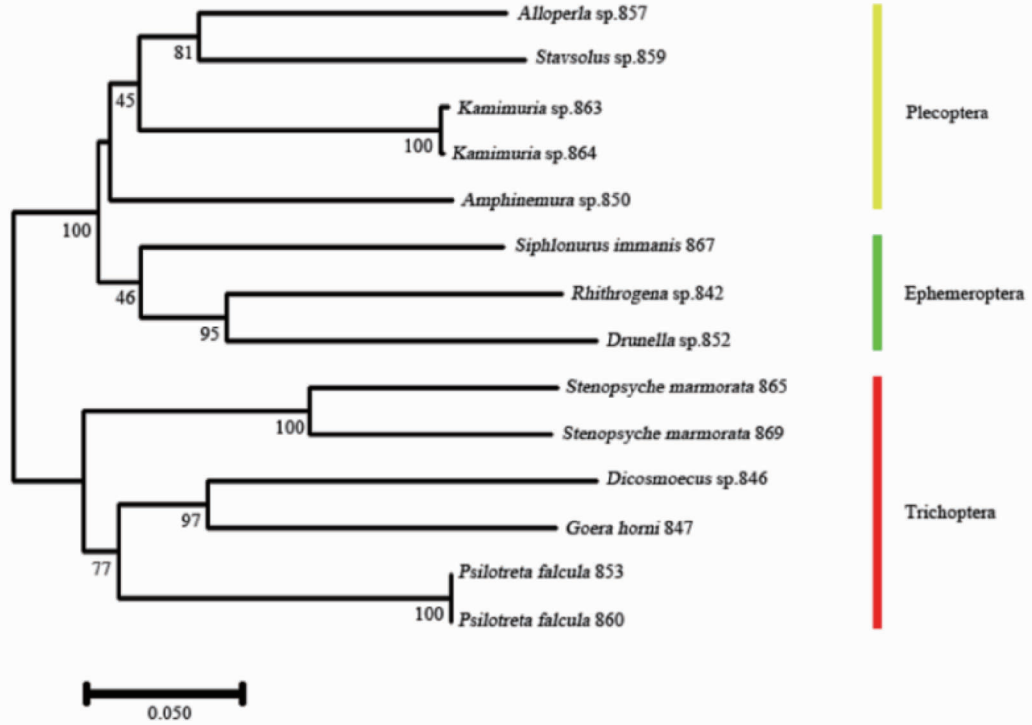


图 1 基于 COI 序列构建的 NJ 树

Fig. 1 NJ tree constructed based on COI sequence

表 1 水生昆虫的 COI 基因信息

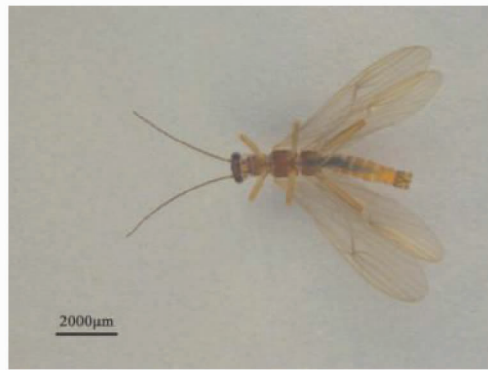
Table 1 Information of COI genes of aquatic insects

目 Order	科 Family	属 Genus	种名 Species	虫态 Insectstate	图号 Fig. No.	样品编号 Sample number	GenBank No.	NCBI 比对信息: GenBank No./种名/相似度 NCBI comparison information: GenBank No./species name /similarity
蜉蝣目 Ephemeroptera (E)	小蜉科 (Ephemereillidae)	弯握蜉属 (<i>Drunella</i>)	<i>Drunella</i> sp.	稚虫	2	SyuDNA852 (11)	MK361192	KF563041/ <i>Drunella sachalinensis</i> /86%
	短丝蜉科 (Siphonuridae)	短丝蜉属 (<i>Siphonurus</i>)	<i>Siphonurus immanis</i>	成虫	3	SyuDNA867 (26)	MK361200	FJ606783/ <i>Siphonurus immanis</i> /98%
	扁蜉科 (Heptageniidae)	溪颈蜉属 (<i>Rhithrogena</i>)	<i>Rhithrogena</i> sp.	稚虫	4	SyuDNA842 (1)	MK361188	HM481019/ <i>Rhithrogena</i> sp./84%
襁翅目 Plecoptera (P)	叉襁科 (Nemouridae)	倍叉襁属 (<i>Amphinemura</i>)	<i>Amphinemura</i> sp.	成虫	5	SyuDNA850 (9)	MK361191	KY262067/ <i>Amphinemura borealis</i> /90%
	绿襁科 (Chloroperlidae)	异襁属 (<i>Alloperla</i>)	<i>Alloperla</i> sp.	成虫	6	SyuDNA857 (16)	MK361194	KJ675162/ <i>Alloperla severa</i> /91%
	石蝇科 (Perlidae)	钩襁属 (<i>Kamimuria</i>)	<i>Kamimuria</i> sp.	稚虫	7	SyuDNA863 (22) SyuDNA864 (23)	MK361197 MK361198	KT186102/ <i>Kamimuria chungnanshana</i> /86%
	网襁科 (Perlodidae)	狭襁属 (<i>Stavsolus</i>)	<i>Stavsolus</i> sp.	成虫	8	SyuDNA859 (18)	MK361195	JF312837/ <i>Arcynopteryx compacta</i> /85%
毛翅目 Trichoptera (T)	角石蛾科 (Stenopsychidae)	角石蛾属 (<i>Stenopsyche</i>)	<i>Stenopsyche marmorata</i>	成虫	9	SyuDNA865 (24) SyuDNA869 (28)	MK361199 MK361201	KX293423/ <i>Stenopsyche marmorata</i> /100%

接下表

续表 1

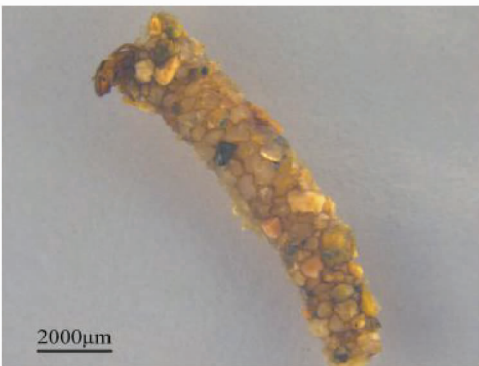
目 Order	科 Family	属 Genus	种名 Species	虫态 Insectstate	图号 Fig. No.	样品编号 Sample number	GenBank No.	NCBI 比对信息: GenBank No./种名/相似度 NCBI comparison information: GenBank No./ species name /similarity
	齿角石蛾科 (Odontoceridae)	裸齿角石蛾 (<i>Psilotreta</i>)	<i>Psilotreta falcula</i>	稚虫	10	SyuDNA853(12)	MK361193	KX293301/ <i>Psilotreta falcula</i> /98%
	瘤石蛾科 (Goeridae)	瘤石蛾属 (<i>Goera</i>)	<i>Goera horni</i>	成虫	12	SyuDNA847(6)	MK361190	KX294869/ <i>Goera horni</i> /99%
	沼石蛾科 (Limnephilidae)	秋石蛾属 (<i>Dicosmoecus</i>)	<i>Dicosmoecus</i> sp.	稚虫	13	SyuDNA846(5)	MK361189	KX293373/ <i>Dicosmoecus jozankeanus</i> /95%

图 2 *Drunella* sp. (背面观)Fig. 2 *Drunella* sp. (dorsal view)图 5 *Amphinemura* sp. (背面观)Fig. 5 *Amphinemura* sp. (dorsal view)图 3 *Siphonurus immanis* (侧面观)Fig. 3 *Siphonurus immanis* (lateral view)图 6 *Alloperla* sp. (侧面观)Fig. 6 *Alloperla* sp. (lateral view)图 4 *Rhithrogena* sp. (背面观)Fig. 4 *Rhithrogena* sp. (dorsal view)图 7 *Kamimuria* sp. (背面观)Fig. 7 *Kamimuria* sp. (dorsal view)

3 结论

此研究结合 DNA 条形码和形态学方法,对洋湖沟所采集的水生昆虫进行鉴别并统计,共得到 EPT 昆虫 11 种,其隶

属于 3 目 11 科;其中蜉蝣目 3 种,襀翅目 4 种,毛翅目有 4 种。EPT 昆虫为敏感性水生昆虫,考虑到采集地区、采集季节及不同地区分类标准不同等因素,依据 EPT 种类丰富度评

图 8 *Stavsolus* sp. (背面观)Fig. 8 *Stavsolus* sp. (dorsal view)图 12 *Goera horni* (侧面观)Fig. 12 *Goera horni* (lateral view)图 9 *Stenopsyche marmorata* (背面观)Fig. 9 *Stenopsyche marmorata* (dorsal view)图 13 *Dicosmoecus* sp. (侧面观)Fig. 13 *Dicosmoecus* sp. (lateral view)图 10 *Psilotreta falcata* (侧面观)Fig. 10 *Psilotreta falcata* (lateral view)图 11 *Psilotreta falcata* (侧面观)Fig. 11 *Psilotreta falcata* (lateral view)

清洁,达到国家 I 类标准。

参考文献

- [1] 渠晓东,张远,马淑芹,等. 太子河流域大型底栖动物群落结构空间分布特征[J]. 环境科学研究,2013,26(5):509-515.
- [2] 中国环境科学研究院. 地表水环境质量标准:GB 3838—2002[S]. 北京:中国环境科学出版社,2002:3-4.
- [3] 刘敬泽. 监测水环境变化的大无脊椎动物[J]. 生物学通报,1999,34(1):35.
- [4] 陈丽,丁建东. EPT 指数在水污染监测方面的应用[J]. 南通大学学报(自然科学版),2005,4(3):26-28.
- [5] HEBERT P D N, CYWINSKA A, BALL S L, et al. Biological identifications through DNA barcodes[J]. Proceedings of the royal society B: Biological sciences, 2003, 270(1512): 313-321.
- [6] HEBERT P D N, RATNASINGHAM S, DE WAARD J R. Barcoding animal life: Cytochrome c oxidase subunit I divergences among closely related species[J]. Proceedings of the royal society B: Biological sciences, 2003, 270(S1): 96-99.
- [7] VOGLER A P, DESALLE R, ASSMANN T, et al. Molecular population genetics of the endangered tiger beetle *Cicindela dorsalis* (Coleoptera: Cicindelidae) [J]. Annals entomological society of America, 1993, 86(2): 142-152.
- [8] KIM I, CHA S Y, YOON M H, et al. The complete nucleotide sequence and gene organization of the mitochondrial genome of the oriental mole cricket, *Gryllotalpa orientalis* (Orthoptera: Gryllotalpidae) [J]. Gene, 2005, 353(2): 155-168.
- [9] FOLMER O, BLACK M, HOEH W, et al. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates[J]. Molecular marine biology and biotechnology, 1994, 3(5): 294-299.
- [10] SAITOU N, NEI M. The neighbour-joining method: A new method for reconstruction phylogenetic trees [J]. Molecular biology and evolution, 1987, 4: 406-425.

价水质标准^[19-21],可以得出辽宁省洋湖沟村太子河源头水质

(下转第 63 页)

表 6 铅、铬、镉的标准曲线

Table 6 Standard curves of lead, chromium and cadmium

重金属 Heavy metal	标准曲线 Standard curve	相关系数 Correlation coefficient(<i>r</i>)
铅 Pb	$Y=4.5241X+0.0296$	0.9997
铬 Cr	$Y=4.7256X+0.0533$	0.9994
镉 Cd	$Y=80.7128X+0.0306$	0.9992

表 7 铅、铬、镉的回收率测定结果

Table 7 Recovery rate determination of lead, chromium and cadmium

重金属 Heavy metal	内控样测定平均浓度 Measuring the average concentration of internal sample //mg/kg	内控样已知浓度 Known concentration of internal control sample//mg/kg	平均回收率 Average recovery rate//%
铅 Pb	22.1	22.0±1.0	100.5
铬 Cr	64.9	66.0±4.0	98.3
镉 Cd	0.167	0.175±0.010	95.4

表 8 清镇市部分农村土壤铅铬镉污染指数

Table 8 The index of some rural soil lead chromium cadmium pollution in Qingzhen City

采样点 Sampling site	单因子污染指数 Single factor pollution index			综合污染指数 Comprehensive pollution index
	铅 Pb	铬 Cr	镉 Cd	
梨倭乡 Lishi Township	0.1014	0.3464	0.4520	0.7120
流长乡 Liuchang Township	0.0914	0.2796	0.4542	0.3755
卫城镇 Weicheng Town	0.1078	0.2550	1.0215	0.7926
麦格乡 Maige Township	0.1040	0.4667	1.1603	0.9163
站街镇 Zhanjie Town	0.0730	0.2764	0.6033	0.5457

3 结论

该研究对清镇市部分农村土壤中铅、铬、镉的含量进行了检测和分析,结果表明,所监测的 5 个乡镇中,土壤铅的含量为 10.8~81.9 mg/kg,平均含量为 32.4 mg/kg;铬的含量为 31.5~193.7 mg/kg,平均含量为 76.5 mg/kg;镉的含量为 0.103~0.792 mg/kg,平均含量为 0.366 mg/kg;土壤 pH 在

5.67~8.60,呈弱酸性或弱碱性,铅和铬均符合我国《土壤环境质量标准》(GB 15618—1995)标准规定的限量值 350、250 mg/kg,卫城镇农村土壤中镉元素超出限量值 0.6 mg/kg,从单因子污染指数可以看出,卫城镇和麦格乡的镉的单因子污染指数 P_{Cd} 分别为 1.0215、1.1603,其他土样的 P_{Cd} 、 P_{Cr} 、 P_{Pb} 的单因子污染指数均小于 1,说明卫城乡和麦格乡受到土壤镉元素的轻度污染。从总体来看,使用综合污染指数分析,监测乡镇土壤中铅、铬、镉均未大于 1,即尚清洁、安全水平。据笔者调查发现,卫城镇与麦格乡受工业影响较大,降低工业废气及废水中镉含量是减少土壤镉污染的主要措施,需有关部门引起关注,以阻止土壤中镉元素的进一步富集和土壤环境质量的进一步恶化。

参考文献

- [1] 王丽君. 浅析土壤环境中的重金属污染[J]. 山西农业科学, 2013, 41(3): 243-245.
- [2] 张建江, 杨胜元, 王林. 贵州土壤环境现状及其防治建议[J]. 贵州地质, 2008, 25(4): 292-296.
- [3] 赵新双. 土壤污染现状及防治措施[J]. 现代农村科技, 2009(12): 37-39.
- [4] 彭帅. 环境污染物在土壤介质中迁移行为研究[D]. 重庆: 重庆大学, 2010.
- [5] 杨志新, 冯圣东, 刘树庆. 镉、锌、铅单元素及其复合污染与土壤过氧化氢酶活性关系的研究[J]. 中国生态农业学报, 2015, 13(4): 138-141.
- [6] 范拴喜, 甘卓亭, 李美娟, 等. 土壤重金属污染评价方法进展[J]. 中国农学通报, 2010, 26(17): 310-315.
- [7] 董鑫瑜, 陈佳琦, 刘帆, 等. 食品及生活用品中重金属检测综述[J]. 化工管理, 2013(12): 237-238.
- [8] 邓秋静, 宋春然, 谢锋, 等. 贵阳市耕地土壤重金属分布特征及评价[J]. 土壤, 2006, 38(1): 53-60.
- [9] 靳辉勇, 齐绍武, 赵世浩, 等. 我国蔬菜重金属污染现状及研究进展[J]. 安徽农业科学, 2015, 43(6): 255-257.
- [10] 何冠华. 不同基因型小麦对土壤重金属污染响应及抗性筛选研究[D]. 郑州: 河南农业大学, 2012.
- [11] 韦猛, 刘永强. 石墨消解-HCP-MS 同时测定土壤中的五种重金属元素[J]. 大众科技, 2016, 18(8): 43-44, 61.
- [12] 徐红颖. 食品中的重金属检测方法研究[J]. 内蒙古石油化工, 2013(1): 22-23.
- [13] 伍云卿, 涂杰峰, 范超, 等. 加标回收实验方案探讨[J]. 福建分析测试, 2010, 19(3): 67-68, 71.
- [14] 宋伟, 陈百明, 刘琳. 中国耕地土壤重金属污染概况[J]. 水土保持研究, 2013, 20(2): 293-298.
- [15] 周长发, 归鸿, 周开亚. 中国蜉蝣目稚虫科检索表(昆虫纲)[J]. 南京师大学报(自然科学版), 2003, 26(2): 65-68.
- [16] 周长发, 归鸿, 周开亚. 中国蜉蝣目成虫科检索表(昆虫纲)[J]. 南京师大学报(自然科学版), 2003, 26(3): 57-60.
- [17] 肖利凤. 新疆北部地区蜉蝣目昆虫种类及多样性研究[D]. 石河子: 石河子大学, 2014: 14-19.
- [18] 董晓立, 胡慧建, 陈思源. 利用水生昆虫评价南昆山溪流的水质[J]. 华南农业大学学报, 1995, 16(3): 6-10.
- [19] 杨莲芳, 李佑文, 戚道光, 等. 九华河水生昆虫群落结构和水质生物评价[J]. 生态学报, 1992, 12(1): 8-15.
- [20] 王备新, 杨莲芳. 我国东部底栖无脊椎动物主要分类单元耐污值[J]. 生态学报, 2004, 24(12): 2768-2775.

(上接第 59 页)

- [11] 王玉玉. 大别山越南蜉 *Vietnamella dabieshanensis* 和桶形赞蜉 *Paegniodes cupulatus* 线粒体基因组序列的测定(昆虫纲: 蜉蝣目)[D]. 南京: 南京师范大学, 2011: 10-18.
- [12] 李娜. 河南省襀科稚虫分类研究[D]. 新乡: 河南科技学院, 2015: 29-31.
- [13] 王志杰. 中国叉襀科分类研究(襀翅目: 叉襀总科)[D]. 扬州: 扬州大学, 2007: 68-87.
- [14] 徐继华. 中国角石蛾科分类及其成幼虫联系研究(昆虫纲: 毛翅目)[D]. 南京: 南京农业大学, 2014: 1-2, 9-26.
- [15] 冷科明, 杨莲芳, 王建国, 等. 江西省毛翅目昆虫名录[J]. 江西植保, 2000, 23(1): 12-16.