

运用 DNA 条形码技术鉴定茶园蜘蛛物种

邢树文, 孙延杰, 朱 慧, 查广才

(韩山师范学院食品工程与生物科技学院, 潮州 521041)

摘要 运用 DNA 条形码技术, 对广东潮州茶园蜘蛛物种进行了分子鉴定。本研究利用基因测序技术获取了凤凰山区域茶园 50 种蜘蛛的 74 条线粒体细胞色素 C 氧化酶亚基 I (mitochondrial cytochrome C oxidase subunit I, COI) 基因序列。使用邻接法 (neighbor joining, NJ) 构建系统发育树, 运用 ABGD (automatic barcode gap discovery) 软件对蜘蛛样本进行聚类分析。结果表明: 邻接法构建的系统发育树聚类结果与 ABGD 软件划分结果以及形态分类鉴定结果相一致, 运用 DNA 条形码可以有效地对蜘蛛物种进行分子鉴定。这对茶园蜘蛛疑难物种和新物种的鉴定具有重要意义, 在茶园蜘蛛物种多样性的研究中也具有重要价值。由此表明, 基于 COI 基因的 DNA 条形码对于本研究中所涉及的蜘蛛物种的划分具有较好的区分结果, 可以作为一种有效的工具在茶园蜘蛛物种鉴定中进行应用。

关键词 蜘蛛; 分子鉴定; 系统发育树; ABGD

中图分类号: Q 959.226.2 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2018131

Molecular identification of spiders in tea plantation based on DNA barcoding

XING Shuwen, SUN Yanjie, ZHU Hui, ZHA Guangcai

(College of Food Engineering and Biotechnology, Hanshan Normal University, Chaozhou 521041, China)

Abstract Molecular identification of spider species in tea plantation was conducted by using DNA barcoding technology in Chaozhou, Guangdong Province. In this study, 74 COI (mitochondrial cytochrome C oxidase subunit I) sequences were amplified from 50 spider species in the tea garden of the Fenghuang Mountains by using gene sequencing technology. The results determined by NJ tree, ABGD (automatic barcode gap discovery) and morphological classification were consistent. Molecular identification of spiders by using the DNA barcodes was effective, which is of great significance for identification of indistinguishable species and new species of tea spiders. At the same time, it is of value in the study of spider species diversity in tea plantations. The results showed that the DNA barcode based on COI gene could be used as an effective tool for identifying spider species in tea plantation.

Key words spider; molecular identification; phylogenetic tree; ABGD

茶园病虫害的生态防控是实现凤凰单丛茶可持续发展的有效途径之一。蜘蛛是农林业害虫重要的捕食性天敌, 是调控虫害的重要生态因子^[1]。因此, 深入研究保护茶区的蜘蛛物种多样性至关重要。传统的形态学分类已有 250 多年的历史, 全世界蜘蛛已知近 47 000 种^[1], 我国仅记录蜘蛛 4 282 种^[2], 还有大量的物种没有发现。传统蜘蛛分类的方法是依据蜘蛛身体外部形态及其生殖器结构的差异区分物种, 但对于体形、大小、体色相似的蜘蛛物种, 或因区域环境变化引起的种内个体差异, 及处于不同

发育阶段的幼蛛, 仅依靠形态特征难免会鉴定错误^[3], 这也是传统分类学鉴定物种受限的原因。自从加拿大科学家 Hebert 等^[4]提出把 DNA 条形码应用到生物物种鉴定之后, DNA 条形码就成为了分类学研究的热点, 尤其在动物物种鉴定上发展迅猛。动物线粒体基因重组率低, 进化速率较快, 且大多数物种 COI 基因可以使用通用引物进行扩增。Hebert 等利用一段 658 bp 标准化的 COI 基因片段对动物进行 DNA 序列分析, 并准确地对动物物种进行了分子鉴定^[5]。由此表明, 利用 COI 基因

收稿日期: 2018-03-27 修订日期: 2018-05-25

基金项目: 广东省教育厅特色创新类项目(2014KTSCX160); 广东省特色重点学科(生物学)建设项目; 潮州市科技计划项目(2014N09)

联系方式 E-mail: xsw501@126.com

片段对蜘蛛物种进行分子鉴定具有一定的可行性。国内学者对利用 DNA 条形码进行物种分类的研究起步较晚,对蜘蛛的分子鉴定研究也较少,如,王丽艳对环京津地区的平腹蛛科^[6]、刘娜对我国西南地区狼蛛科和漏斗蛛科^[7]、曹潇巍对中国拟遁蛛属^[8]及何静超等对河北小五台山蟹蛛科^[9]进行了 DNA 条形码的分类研究。因此,我国蜘蛛分类学家 DNA 条形码序列基因库的建设和完善还任重道远。蜘蛛分布广,适应性强,其形态与体型易受环境变化的影响,因此,传统形态学分类方法对一些隐存种、相近种的雌雄配对,以及对处于不同发育期的幼蛛的分类鉴定有一定困难,而运用 DNA 条形码技术可以解决传统分类上存在的疑难问题。本研究选用分布于凤凰山茶区的 50 种蜘蛛 74 个样本作为试验材料,利用线粒体 CO I 基因片段构建基于分子数据的系统发育树,探索了 DNA 条形码技术

对凤凰山茶区蜘蛛物种鉴定的准确性,对明确凤凰单丛茶区的蜘蛛资源及蜘蛛物种的多样性具有重要意义。该成果将填补凤凰山茶区蜘蛛分类学及其多样性研究的学科空白,同时对该茶区生境的保护与评价、蜘蛛资源在生物防治中的应用等具有积极意义。

1 材料与方法

1.1 标本采集及形态鉴定

本研究所用的蜘蛛样本采集于潮州凤凰山茶区不同海拔高度的茶园,包括凤凰镇桥头村茶园(海拔 360 m)、上春村茶园和笔岭村茶园(海拔 520 m)、叫水坑村茶园(海拔 690 m)和天池茶园(海拔 930 m)。本次测序使用了 50 种蜘蛛的 74 个样本,测序前使用形态学分类的方法对蜘蛛样本进行物种鉴定,蜘蛛分类结果如表 1 所示。

表 1 所用蜘蛛标本信息
Table 1 Spider samples used in this study

科 Family	属 Genus	物种 Species	样本数 Sample number	样本代号 Sample ID	
跳蛛科 Salticidae	蛤莫蛛属 <i>Harmochirus</i>	鳃蛤莫蛛 <i>Harmochirus brachiatus</i>	2	FHTC01	
		斑蛛属 <i>Euophrys</i>	白触斑蛛 <i>Euophrys albopopdis</i>	2	FHTC02
		哈沙蛛属 <i>Hasarius</i>	花哈沙蛛 <i>Hasarius adansoni</i>	2	FHTC03
		猎蛛属 <i>Evarcha</i>	白斑猎蛛 <i>Evarcha albaria</i>	1	FHXB04
		猫跳蛛属 <i>Carrhotus</i>	黑猫跳蛛 <i>Carrhotus xanthogramma</i>	1	FHJSK05
		蝇虎属 <i>Rhene</i>	暗宽胸蝇虎 <i>Rhene atrata</i>	1	FHJSK06
优列蛛科 Eutichuridae	红螯蛛属 <i>Chiracanthium</i>	皮氏红螯蛛 <i>Chiracanthium pichoni</i>	1	FHTC07	
		精美红螯蛛 <i>Chiracanthium exquestitum</i>	2	FHTC08	
猫蛛科 Oxyopidae	猫蛛属 <i>Oxyopes</i>	类斜纹猫蛛 <i>Oxyopes sertatoides</i>	4	FHJSK09	
		斜纹猫蛛 <i>Oxyopes sertatus</i>	1	FHJSK10	
		线纹猫蛛 <i>Oxyopes lineatipes</i>	1	FHWD11	
蟹蛛科 Thomisidae	蟹蛛属 <i>Thomisus</i>	细纹猫蛛 <i>Oxyopes macilentus</i>	1	FHWD12	
		满蟹蛛 <i>Thomisus onustus</i>	1	FHTC13	
		角红蟹蛛 <i>Thomisus labe factus</i>	2	FHJSK14	
球蛛科 Theridiidae	球蛛属 <i>Theridion</i>	黑丽蛛 <i>Chryso nigra</i>	1	FHJSK15	
		漏斗球蛛 <i>Theridion chonetum</i>	3	FHTC16	
		多色球蛛 <i>Theridion varians</i>	1	FHTC17	
		胡氏球蛛 <i>Theridion hui</i>	1	FHML18	
肖蛸科 Tetragnathidae	银鳞蛛属 <i>Leucauge</i>	肩斑银鳞蛛 <i>Leucauge blanda</i>	2	FHTC19	
		西里银鳞蛛 <i>Leucauge celebesiana</i>	1	FHTC20	
	肖蛸属 <i>Tetragnatha</i>	羽斑肖蛸 <i>Tetragnatha pinicola</i>	2	FHXB21	
皿蛛科 Linyphiidae	盖蛛属 <i>Neriene</i>	前齿肖蛸 <i>Tetragnatha praedonia</i>	1	FHXB22	
		黑斑盖蛛 <i>Neriene nigri pectoris</i>	1	FHTC23	
沟瘤蛛属 <i>Ummeliata</i>	食虫沟瘤蛛 <i>Ummeliata insecticeps</i>	1	FHJSK24		
	巨蟹蛛属 <i>Heteropoda</i>	白额巨蟹蛛 <i>Heteropoda venatoria</i>	3	FHSC25	
漏斗蛛科 Agelenidae	漏斗蛛属 <i>Agelena</i>	森林漏斗蛛 <i>Agelena silvatica</i>	1	FHJSK26	
		机敏异漏斗蛛 <i>Allagelena difficilis</i>	2	FHTC27	
栅蛛科 Hahniidae	栅蛛属 <i>Hahnia</i>	栓栅蛛 <i>Hahnia corticicola</i>	2	FHJSK28	
		梨形栅蛛 <i>Hahnia pyri formis</i>	1	FHJSK29	

续表 1 Table 1(Continued)

科 Family	属 Genus	物种 Species	样本数 Sample number	样本代号 Sample ID
平腹蛛科 Gnaphosidae	平腹蛛属 <i>Gnaphosa</i>	佐贺平腹蛛 <i>Gnaphosa kompirensis</i>	1	FHSC30
长纺蛛科 Hersiliidae	长纺蛛属 <i>Hersilia</i>	波纹长纺蛛 <i>Hersilia striata</i>	1	FHJSK31
		亚洲长纺蛛 <i>Hersilia asiatica</i>	1	FHJSK32
狼蛛科 Lycosidae	水狼蛛属 <i>Pirata</i>	真水狼蛛 <i>Pirata piraticus</i>	1	FHML33
		盗水狼蛛 <i>Pirata praedo</i>	1	FHML34
		拟水狼蛛 <i>Pirata subpiraticus</i>	1	FHJSK35
		细毛小水狼蛛 <i>Piratula tenuisetaceus</i>	1	FHJSK36
	马蛛属 <i>Hippasa</i>	格里马蛛 <i>Hippasa greenalliae</i>	3	FHTC37
	豹蛛属 <i>Pardosa</i>	沟渠豹蛛 <i>Pardosa laura</i>	2	FHJSK38
		幼豹蛛 <i>Pardosa pusiola</i>	3	FHXB39
管巢蛛科 Clubionidae	管巢蛛属 <i>Clubiona</i>	谷川管巢蛛 <i>Clubiona tanikawai</i>	1	FHJSK40
		羽斑管巢蛛 <i>Clubiona jucunda</i>	1	FHJSK41
米图蛛科 Miturgidae	黄蛛属 <i>Xantharia</i>	盔黄蛛 <i>Xantharia galea</i>	1	FHJSK42
园蛛科 Araneidae	园蛛属 <i>Araneu</i>	黄斑园蛛 <i>Araneu ejusmodi</i>	1	FHTC43
		黑斑园蛛 <i>Araneu miti ficus</i>	3	FHTC44
		艾蛛属 <i>Cyclosa</i>	突尾艾蛛 <i>Cyclosa conica</i>	3
	八氏蛛属 <i>Yaginumia</i>	浊斑艾蛛 <i>Cyclosa confusa</i>	1	FHJSK46
		日本艾蛛 <i>Cyclosa japonica</i>	1	FHSC47
		叶斑八氏蛛 <i>Yaginumia sia</i>	1	FHTC48
		盲蛛目 Opiliones	Opiliones sp. 1	1
Opiliones sp. 2	1		FHTC50	

1.2 DNA 提取与 PCR 扩增

DNA 提取采用 Sambrook 等^[10]和 杨聪慧等^[11]的方法, 利用 Animal tissue Genomic DNA Kit 提取蜘蛛总 DNA, 操作步骤依照试剂盒的操作说明进行。提取的总 DNA 用琼脂糖电泳检测后置于 -80℃ 冰箱保存、备用。采用 Folmer 等^[12]的方法, 使用通用引物 LCO1490 (5'-GGTCAA CAAAT-CATAAAGATATT GG-3') 和 HCO 2198 (5'-TA-AACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3') 对供试的 74 个蜘蛛样本进行线粒体 COI 基因扩增, 扩增片段的长度约为 680 bp。PCR 扩增体系^[13]为 25 μL: Master-Mix 12.5 μL, LCO1490 (10 μmol/L)\HCO 2198 (10 μmol/L) 各 0.8 μL, ddH₂O 8.9 μL, DNA 模板 2.0 μL。PCR 扩增的反应条件为: 94℃ 预变性 5 min; 35 个循环, 94℃ 预变性 30 s, 45℃ 退火 40 s, 72℃ 延伸 1 min; -20℃ 保存。

1.3 数据分析

1.3.1 DNA 序列的比对

PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳法检测, 上样量为 2 μL, 电压 100 V, 在 UVP 凝胶成像系统下观察和拍照。扩增结果良好 (约 700 bp 有单一的亮带) 的 PCR 产物, 委托苏州金唯智生物科技有限公司进行双向测序。测序结果以 Chromas 软件判断

基因测序峰图质量, 人工校对碱基, 确定 CO I 基因片段序列的正确性, 以 DNASTAR 6.0 软件中的子程序 SeqMan 拼接双向测序结果, FASTA 格式输出, 采用 Clustal X 软件^[13-14]对最终校对确认的 DNA 序列进行多重序列比对分析。

1.3.2 系统发育树的构建与遗传距离的计算

利用 MEGA 6.0 软件, 采用双参数模型 (Kimura 2-parameter, K2P)^[16] 计算各分类单元之间的种间遗传距离, 同时分析其序列的碱基组成情况及密码子的使用率。画出频率分布直方图, 进行 “barcoding gap”^[17] 分析。以盲蛛序列作为外群, 邻接法 (neighbor joining, NJ) 构建蜘蛛的系统发育树, 并进行内部分支检验与 1 000 次 bootstrap 检验分析, 确定各支系的置信度。如果在进化树上同一个物种能聚成一个单系, 则认为 NJ 分子系统发育树能将此物种与其他物种区分开, 反之则不能区分开。

1.3.3 ABGD 的划分

使用 ABGD (automatic barcode gap discovery) 软件^[18], 基于遗传距离划分样本, 划分在同一组的样本被认定属于同一物种。本试验将 50 种蜘蛛 74 个样本的 K2P 遗传距离矩阵在线提交到 ABGD 网站 (<http://wwwabi.snv.jussieu.fr/public/abgd/>), *P*

(prior intraspecific divergence) 设为 0.001~0.1, 最小相对 gap 宽度值 X (minimum relative gap width) 为 1.0, 然后将样本划分结果与形态鉴定结果比较对照。

2 结果与分析

2.1 CO I 基因碱基组成

利用 MEGA 6.0 软件^[15]对 50 种蜘蛛 CO I 基

因的 74 条序列和 1 个外群 2 条序列进行碱基组成分析, 结果见表 2。T、C、A、G 的平均含量分别为 42.3%、13.1%、26% 和 18.7%, A+T 含量为 68.3%, 有明显的 AT 偏向性。蜘蛛 CO I 基因各位点碱基组成频率及替换型式, 如表 3 所示。平均碱基相同位点为 434 个, 平均转换数为 39 个, 平均颠换数为 55 个, 平均颠换与转换比为 0.72; 颠换主要以 A-T 为主, 转换主要以 T-C 为主。

表 2 CO I 基因碱基组成¹⁾

Table 2 Nucleotide composition of CO I gene

长度/bp Length	C/个	V/个	Pi/个	S/个	T/%	C/%	A/%	G/%	A+T/%
529	229	300	277	23	42.3	13.1	26.0	18.7	68.3

1) C: 保守位点; V: 变异位点; Pi: 简约信息位点; S: 单态位点。

C: Conserved site; V: Variation point; Pi: Parsimony informative site; S: Singleton site.

表 3 CO I 基因碱基组成频率及替换模型¹⁾

Table 3 Nucleotide substitution and frequency and substitution pattern of CO I gene

Domain	ii	si	sv	R	TT	TC	TA	TG	CT	CC	CA	CG	AT	AC	AA	AG	GT	GC	GA	GG
1	434.0	39.0	55.0	0.72	192.0	8.0	19.0	6.0	7.0	59.0	1.0	1.0	19.0	2.0	104.0	13.0	5.0	2.0	13.0	79.0
1st	170.0	3.0	4.0	0.72	81.0	1.0	1.0	0.0	1.0	41.0	0.0	1.0	0.0	0.0	21.0	0.0	0.0	1.0	0.0	27.0
2nd	109.0	25.0	42.0	0.58	64.0	3.0	16.0	4.0	3.0	0.0	1.0	0.0	16.0	1.0	41.0	9.0	4.0	0.0	9.0	4.0
3rd	156.0	12.0	8.0	1.41	48.0	3.0	3.0	1.0	3.0	18.0	0.0	0.0	3.0	0.0	42.0	3.0	1.0	0.0	3.0	48.0

1) ii: 相同碱基位点; si: 转换数; sv: 颠换数; R (si/sv): 转换/颠换比。

ii: Identical pair; si: Transitional pair; sv: Transversional pair; R: si/sv.

2.2 基于 P 距离的碱基替换饱和性分析

DNA 的碱基替换类型有转换 (transition, TS) 和颠换 (transversion, TV) 两种类型。本研究对 50 种蜘蛛 74 个样本进行 DNA 条形码序列扩增分析, 以 TS 和 TV 为纵坐标, 以遗传距离为横坐标, 建立二维坐标图用以估计 DNA 序列碱基饱和度状况。图 1 显示, TS、TV 随着 P 距离的增加而线性增加, 未表现出饱和态势, 说明凤凰山区茶园的蜘蛛有很强的系统发育信号, 碱基的位点及置换关系均可用于分析和解释蜘蛛的系统发育, 见图 1。

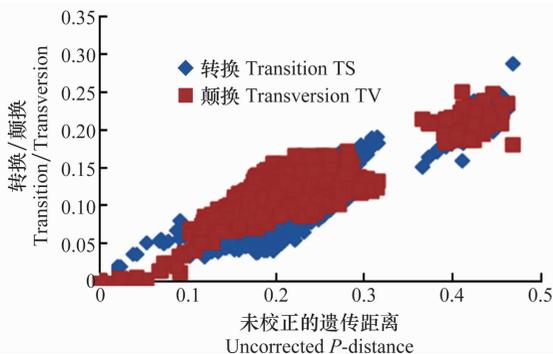


图 1 CO I 基因碱基替换饱和性分析

Fig. 1 Substitution saturation analysis of CO I gene

2.3 系统发育树聚类结果

本试验中, 对 74 头蜘蛛样本采用邻接法, 以 2 条盲蛛目的 CO I 序列为外群构建凤凰山茶区蜘蛛群落的 NJ 系统发育树, 聚类结果如图 2 所示。聚类结果表明, 外群两种盲蛛与 50 种蜘蛛被划分为姐妹群, 74 个蜘蛛样本聚类后没有出现物种交叉的现象, 50 种蜘蛛各自聚成一个单系群, 不同蜘蛛被明显区分。NJ 树中显示, 除白触斑蛛 *Euophrys albopopdis* 外, 其余不同种蜘蛛的支持率均超过 90% 以上。

2.4 遗传距离与 ABGD 划分结果分析

以 K2P 模型计算 50 种蜘蛛 CO I 序列的种间遗传距离结果表明, 522 条序列的种间平均距离为 0.02~0.229, 其中, 黑斑盖蛛 *Neriene nigripectoris* 与皮氏红螯蛛 *Chiracanthium pichoni* 之间的平均遗传距离最大, 为 0.229, 突尾艾蛛 *Cyclosa conica* 与浊斑艾蛛 *Cyclosa confusa*、日本艾蛛 *Cyclosa japonica* 之间平均遗传距离最小, 为 0.02。74 个蜘蛛样本序列依据 1% 的序列差异被分为 50 组。其中, 除白触斑蛛 *Euophrys albopopdis* 两个样本不支持该物种外, 其余蜘蛛物种全部一一对应, DNA 条形码分子鉴定与形态学鉴定的结果吻合度为 98% (49/50)。

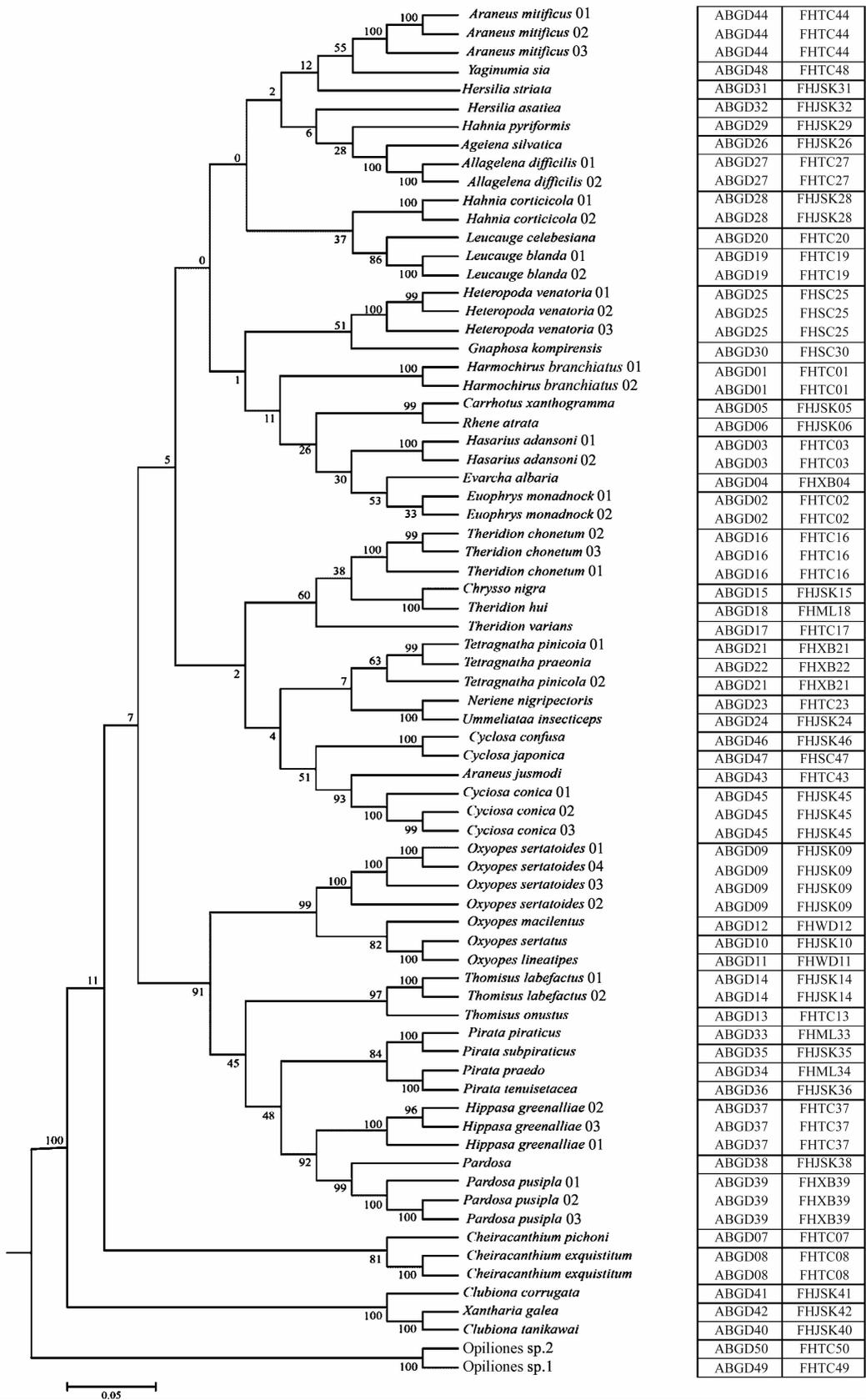


图 2 基于 CO I 序列构建的凤凰单丛茶园蜘蛛的系统发育树(NJ 树)

Fig. 2 Phylogenetic tree of the spiders based on CO I gene sequences in Fenghuang Dancong tea plantation (NJ tree)

本试验对 74 个蜘蛛样本(包含外群)的 ABGD 划分结果包括初始划分(initial partition)和递归划分(recursive partition)两种情况。递归划分较为稳定,遗传距离在 0.001~0.1 之间,包括外群在内的 74 个蜘蛛样本被分成 50 组,支持 50 个蜘蛛物种(见图 3)。而初始划分结果在 0.001~0.001 7 之间,被分成 42.67 组,支持 42.67 个蜘蛛物种;遗传距离在

0.002 8~0.004 6 之间,被划分为 48 组;遗传距离在 0.007 7~0.100 0 之间,被划分为 50 组。遗传距离在 42.67~50.00 之间, P 值范围浮动较大,不够稳定,而递归划分较为稳定,包括外群在内的 74 个蜘蛛样本被分成 50 组,与形态学的鉴定结果吻合度较高(表 4)。ABGD 的划分结果与 NJ 树呈现对应关系,每个 ABGD 的划分结果 NJ 发育树上均已标明,如图 2 所示。

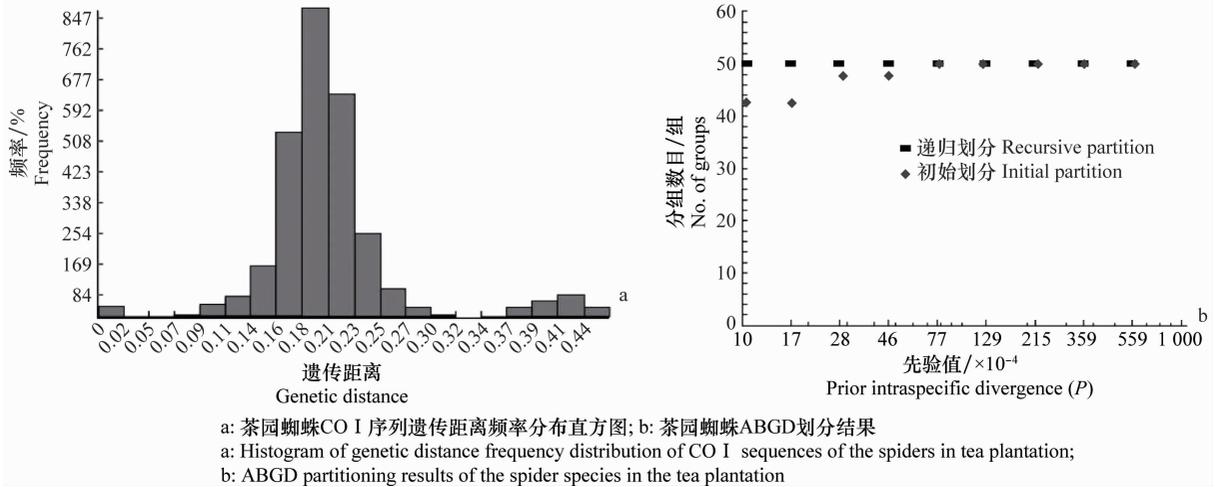


图 3 基于 K2p 的茶园蜘蛛种间遗传距离分布及 ABGD 划分结果

Fig. 3 Genetic distance distribution and ABGD partitioning results of the spider species in the tea plantation based on K2p

表 4 凤凰单丛茶园蜘蛛最小相对 Gap 宽度值为 1.0 阈值分类与形态种类对照

Table 4 Comparison of the minimum relative Gap width of the 1.0 threshold classification and the morphological type of the spider in Fenghuang Dancong tea plantation

ABGD	样本代号 Sample ID	蜘蛛物种 Spider species	ABGD	样本代号 Sample ID	蜘蛛物种 Spider species
ABGD44	FHTC44	<i>Araneus mitificus</i>	ABGD24	FHJSK24	<i>Ummeliata insecticeps</i>
ABGD48	FHTC48	<i>Yaginumia sia</i>	ABGD46	FHJSK46	<i>Cyclosa confusa</i>
ABGD31	FHJSK31	<i>Hersilia striata</i>	ABGD47	FHSC47	<i>Cyclosa japonica</i>
ABGD32	FHJSK32	<i>Hersilia asiatica</i>	ABGD43	FHTC43	<i>Araneus ejusmodi</i>
ABGD29	FHJSK29	<i>Hahnia pyriformis</i>	ABGD45	FHJSK45	<i>Cyclosa conica</i>
ABGD26	FHJSK26	<i>Agelena silvatica</i>	ABGD09	FHJSK09	<i>Oxyopes sertatoides</i>
ABGD27	FHTC27	<i>Allagelena difficilis</i>	ABGD12	FHWD12	<i>Oxyopes macilentus</i>
ABGD28	FHJSK28	<i>Hahnia corticola</i>	ABGD10	FHJSK10	<i>Oxyopes sertatus</i>
ABGD20	FHTC20	<i>Leucauge celebesiana</i>	ABGD11	FHWD11	<i>Oxyopes lineatipes</i>
ABGD19	FHTC19	<i>Leucauge blanda</i>	ABGD14	FHJSK14	<i>Thomisus labe factus</i>
ABGD25	FHSC25	<i>Heteropoda venatoria</i>	ABGD13	FHTC13	<i>Thomisus onustus</i>
ABGD30	FHSC30	<i>Gnaphosa kompirenensis</i>	ABGD33	FHML33	<i>Pirata piraticus</i>
ABGD01	FHTC01	<i>Harmochirus branchiatus</i>	ABGD35	FHJSK35	<i>Pirata subpiraticus</i>
ABGD05	FHJSK05	<i>Carrhotus xanthogramma</i>	ABGD34	FHML34	<i>Pirata praedo</i>
ABGD06	FHJSK06	<i>Rhena atrata</i>	ABGD36	FHJSK36	<i>Piratula tenuisetacea</i>
ABGD03	FHTC03	<i>Hasarius adansoni</i>	ABGD37	FHTC37	<i>Hippasa greenalliae</i>
ABGD04	FHXB04	<i>Evarcha albaria</i>	ABGD38	FHJSK38	<i>Pardosa laura</i>
ABGD02	FHTC02	<i>Euophrys monadnock</i>	ABGD39	FHXB39	<i>Pardosa pusiola</i>
ABGD16	FHTC16	<i>Theridion chonetum</i>	ABGD07	FHTC07	<i>Cheiracanthium pichoni</i>
ABGD15	FHJSK15	<i>Chryso nigr</i>	ABGD08	FHTC08	<i>Cheiracanthium exquestitum</i>
ABGD18	FHML18	<i>Theridion hui</i>	ABGD41	FHJSK41	<i>Clubiona corrugata</i>
ABGD17	FHTC17	<i>Theridion varians</i>	ABGD42	FHJSK42	<i>Xantharia galea</i>
ABGD21	FHXB21	<i>Tetragnatha pinicola</i>	ABGD40	FHJSK40	<i>Clubiona tanikawai</i>
ABGD22	FHXB22	<i>Tetragnatha praedonia</i>	ABGD50	FHTC50	<i>Opiliones sp. 2</i>
ABGD23	FHTC23	<i>Nerene nigripectoris</i>	ABGD49	FHTC49	<i>Opiliones sp. 1</i>

3 讨论

本研究以邻接法与通用引物对凤凰山茶园的 74 个不同种类的蜘蛛样本构建 NJ 系统发育树, 74 个样本 1% 的 CO I 序列利用 ABGD 分成了 50 组, DNA 条形码技术的分子鉴定结果中, 只有白触斑蛛不支持形态学鉴定结果, 其余蜘蛛物种的分子鉴定与形态学鉴定结果高度吻合。分子阈值分类结果与形态学鉴定的误差只有 2.00%, 证明了 DNA 条形码技术对物种进行分子鉴定的有效性。除白触斑蛛外, 每个蜘蛛物种聚类明显, 没有出现物种交叉现象, 并且均各自聚成一个单系群, 且各单系分支的支持率均超过 90%, CO I 序列在凤凰山茶园蜘蛛的鉴定中准确性较高, 表明本研究的 DNA 条形码可以作为凤凰山蜘蛛鉴定的重要数据。

ABGD 方法是基于一定范围的先验值 P 自动探测给定数据集的“barcoding gap”^[19-20], 在一定程度 ABGD 减少了阈值定义的人为因素, 降低了基于最小距离法分类法界定的主观性, 并且具有较高的准确性。本研究中运用 ABGD 软件对凤凰山蜘蛛 74 个样本进行分组划分, 结果与传统形态学分类鉴定的结果完全一致, 本研究初步评估了凤凰山茶区蜘蛛物种的多样性^[21], DNA 条形码技术为该茶区蜘蛛分类学、生态学及相关研究开拓了物种分类新的研究领域和更具备前沿技术的新方法, 为保护和恢复该茶区蜘蛛种群提供了可靠依据^[22]。但对一些动物分化期较短的物种, 因其极小的种内遗传距离, 从而导致基于进化树和遗传距离的条形码技术不能准确鉴定这些物种。因此, DNA 条形码技术在众多物种鉴定中还需要大量试验的验证, 才能更好地完善其在更多生物物种分类上的应用。自然界中生物因地理区域分布、环境及气温等各种因素的影响, 物种分化期和进化速率不同, 只依靠 DNA 条形码技术还不能完全区分自然界中千变万化的生物物种。因此, 运用 DNA 序列的分析对蜘蛛进行分子鉴定必须结合传统的形态分类学方法, 才是快捷、准确鉴定蜘蛛物种的科学方法^[23], 脱离传统分类学而开展 DNA 条形码研究不可能取得科学准确的成果^[24-25]。由于蜘蛛存在潜在的新种、隐存种或复合种, 因此, 对蜘蛛物种进行单分子标记是 DNA 条形码技术应用的关键, 对某一蜘蛛选择特征性的基因片段与其 CO I 序列共同作为 DNA 条形码的

标记基因, 对这些疑难种进行分子鉴定才能获取更高的正确率^[26]。在本研究中, 由于受到采集时间、地理区域等因素的限制, 采集的蜘蛛样本数量偏少, 从而凸显所鉴定的蜘蛛物种代表性欠缺。我们在以后的研究中, 将补充各季节和不同海拔、不同环境茶区的蜘蛛标本, 采集更多的茶区蜘蛛 DNA 条形码序列的数据, 初步构建一个较为完整的凤凰山茶区蜘蛛条形码数据库。

参考文献

- [1] PLATNICK N I. The world spider catalog, version 13. 5 [DB/OL]. (2013 - 05 - 06) [2018 - 5 - 22]. <http://research.amnh.org/iz/spiders/catalog/INTRO1.html>.
- [2] 李枢强, 林玉成. 中国生物物种名录. 第 3 卷. 动物. 无脊椎动物 1[M]. 北京: 科学出版社, 2015.
- [3] PADIAL J M, MIRALLES A, DE LA RIVA I, et al. The integrative future of taxonomy [J]. *Frontiers in Zoology*, 2010, 7(1): 16.
- [4] 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: 313 - 321.
- [5] HEBERT P D N, RATNASINGHAM S, DEWAARD 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: S96 - S99.
- [6] 王丽艳. 环京津地区平腹蛛分类及 DNA 条形码研究 [D]. 保定: 河北大学, 2016.
- [7] 刘娜. 狼蛛科和漏斗蛛科拟隙蛛属蜘蛛 DNA 条形码研究 [D]. 重庆: 西南大学, 2015.
- [8] 曹潇巍. 基于形态与生物条形码的中国拟遁蛛属 (*Pseudopoda* Jäger, 2000) 蜘蛛分类学研究 (蜘蛛目: 蟹蛛科) [D]. 武汉: 湖北大学, 2016.
- [9] 何静超, 胡岚岚, 郭晨辉, 等. 小五台山蟹蛛 DNA 条形码分子鉴定 [J]. *河北大学学报 (自然科学版)*, 2016, 36(3): 286 - 292.
- [10] SAMBROOK J F, FRITSCH E F, MANIATIS T. *Molecular cloning, a laboratory manual* [M]. 2nd ed. New York, Cold Spring Harbor: Laboratory Press, 1989.
- [11] 杨聪慧, 金倩, 陈付强, 等. 基于进化树、距离和特征的 DNA 条形码方法研究——以百花山地区草螟科为例 [J]. *应用昆虫学报*, 2013, 50(1): 61 - 70.
- [12] 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 & Biotechnology*, 1994, 3(5): 294 - 299.
- [13] 杨聪慧, 韩辉林, 迟美妍, 等. DNA 条形码技术在北京百花山地区夜蛾科物种鉴定中的应用 [J]. *昆虫学报*, 2012, 55(9): 1082 - 1092.

- [10] 黄晓杰, 李婧, 柴媛, 等. MeJA 处理对蓝莓果实采后灰霉病的影响及机理[J]. 食品科学, 2016, 37(22): 307-312.
- [11] ZAPATA P J, MARTINEZ-ESPLÁ A, GUILLÉN F, et al. Preharvest application of methyl jasmonate (MeJA) in two plum cultivars. 2. Improvement of fruit quality and antioxidant systems during postharvest storage[J]. Postharvest Biology and Technology, 2014, 98: 115-122.
- [12] SHADMANI N, AHMAD S H, SAARI N, et al. Chilling injury incidence and antioxidant enzyme activities of *Carica papaya* L. 'Frangi' as influenced by postharvest hot water treatment and storage temperature[J]. Postharvest Biology and Technology, 2015, 99: 114-119.
- [13] SHI Junyan, GAO Lipu, ZUO Jinhua, et al. Exogenous sodium nitroprusside treatment of broccoli florets extends shelf life, enhances antioxidant enzyme activity, and inhibits chlorophyll-degradation[J]. Postharvest Biology and Technology, 2016, 116: 98-104.
- [14] 曹建康, 姜微波, 赵玉梅. 果蔬采后生理生化实验指导[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2007.
- [15] GLOWACZ M, ROETS N, SIVAKUMAR D. Control of anthracnose disease via increased activity of defence related enzymes in 'Hass' avocado fruit treated with methyl jasmonate and methyl salicylate [J]. Food Chemistry, 2017, 234: 163-167.
- [16] 田世平, 罗云波, 王贵禧. 园艺产品采后生物学基础[M]. 北京: 科学出版社, 2011: 43-55, 312-318.
- [17] 向妙莲, 赵显阳, 陈明, 等. 茉莉酸甲酯诱导辣椒抗青枯病与活性氧代谢的关系[J]. 园艺学报, 2017, 44(10): 1985-1992.
- [18] 姜璐璐. 茉莉酸甲酯对葡萄果实常温保鲜效果及其机理研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2015.
- [19] WANG Kaituo, LIAO Yunxia, KAN Jianquan, et al. Response of direct or priming defense against *Botrytis cinerea* to methyl jasmonate treatment at different concentrations in grape berries [J]. International journal of food microbiology, 2015, 194: 32-39.
- [20] 郭娟华, 陈明, 涂起红, 等. 类芽孢杆菌 YS-1 代谢产物粗提液对柑橘青霉病的生防效果[J]. 植物保护学报, 2013, 40(6): 573-574.
- [21] 陆建英, 杨晓明, 王昶, 等. 不同诱抗剂防治豌豆白粉病的效果及对防御酶的影响[J]. 植物保护, 2017, 43(5): 221-224.
- [22] 田国忠, 李怀方, 裘维蕃. 植物过氧化物酶研究进展[J]. 植物科学学报, 2001, 19(4): 332-344.
- [23] GRIGORAS A G. Catalase immobilization—A review [J]. Biochemical Engineering Journal, 2017, 117: 1-20.
- [24] MENG Demei, ZHANG Yaxuan, YANG Rui, et al. Arginase participates in the methyl jasmonate-regulated quality maintenance of postharvest *Agaricus bisporus* fruit bodies [J]. Postharvest Biology and Technology, 2017, 132: 7-14.
- [25] FAN Linlin, WANG Qing, LV Jiayu, et al. Amelioration of postharvest chilling injury in cowpea (*Vigna sinensis*) by methyl jasmonate (MeJA) treatments [J]. Scientia Horticulturae, 2016, 203: 95-101.

(责任编辑: 田 喆)

(上接 50 页)

- [14] LARKIN M A, BLACKSHIELDS G, BROWN N P, et al. Clustal W and Clustal X version 2.0 [J]. Bioinformatics, 2007, 23(21): 2947-2948.
- [15] TAMURA K, STECHER G, PETERSON D, et al. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0 [J]. Molecular Biology and Evolution, 2013, 30: 2725-2729.
- [16] KIMURA M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences [J]. Journal of Molecular Evolution, 1980, 16(2): 111-120.
- [17] MEYER C P, PAULAY G. DNA barcoding: error rates based on comprehensive sampling [J/OL]. PLoS Biology, 2005, 3(12): e422. DOI:10.1371/Journal.pbio.0030422.
- [18] PUILLANDRE N, LAMBERT A, BROUILLET S, et al. AB-GD, automatic barcode gap discovery for primary species delimitation [J]. Molecular Ecology, 2011, 21(8): 1864-1877.
- [19] HEBERT P D N, STOECKLE M Y, ZEMLAKE T S, et al. Identification of birds through DNA barcodes [J]. PLoS Biology, 2004, 2: 1657-1663.
- [20] BURNS J M, JANZEN D H, HAJIBABAEI M, et al. DNA barcodes of closely related (but morphologically and ecologically distinct) species of skipper butterflies (Hesperiidae) can differ by only one to three nucleotides [J]. Journal of the Lepidopterists Society, 2007, 61(3): 138-153.
- [21] BUCKLIN A, HOPCROFT R R, KOSOBOKOVA K N, et al. DNA barcoding of Arctic Ocean holozooplankton for species identification and recognition [J]. Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography, 2010, 57(1/2): 40-48.
- [22] NARO-MACIEL E, REID B, FITZSIMMONS N N, et al. DNA barcodes for globally threatened marine turtles: a registry approach to documenting biodiversity [J]. Molecular Ecology Resources, 2009, 10(2): 252-263.
- [23] 傅美兰, 彭建军, 王莹, 等. DNA 条形码技术的应用与分析[J]. 河南师范大学学报(自然科学版), 2010, 38(4): 118-122.
- [24] LIPSCOMB D, PLATNICK N, WHEELER Q, et al. The intellectual content of taxonomy: a comment on DNA taxonomy [J]. Trends in Ecology and Evolution, 2003, 18(2): 65-66.
- [25] TAUTZ D, ARCTANDER P, MINELLI A, et al. A plea for DNA taxonomy [J]. Trends in Ecology & Evolution, 2003, 18(2): 70-74.
- [26] 李晓叶, 钱路, 陈茂华. DNA 条形码技术在几种苹果园鳞翅目害虫鉴定中的应用[J]. 西北农业学报, 2015, 24(5): 141-147.

(责任编辑: 田 喆)