

我国外来入侵生物福寿螺种类的多重PCR鉴别方法

贺超 杨倩倩* 刘苏汶 刘光富 俞晓平*

(中国计量大学生命科学学院, 浙江省生物计量及检验检疫重点实验室, 杭州 310018)

摘要: 为研发能快速、准确地鉴别在我国为害严重的3种福寿螺——小管福寿螺 *Pomacea canaliculata*、斑点福寿螺 *P. maculata* 和新发现入侵种 *Pomacea* sp. 的PCR技术, 基于其线粒体全基因组序列, 通过比对分析找到种间差异区段, 分别设计并筛选了上述3种福寿螺的特异性引物对, 建立了多重PCR检测方法, 对其特异性和灵敏度进行评价。结果表明, 所设计的引物特异性强, 能从不同地理种群的小管福寿螺、斑点福寿螺和 *Pomacea* sp. 中分别扩增出1 238、901和571 bp的特异性条带, 阴性对照无条带; 退火温度为60℃时, 32个扩增循环的检测灵敏度可达1 ng样品DNA量。所构建的多重PCR体系可应用于福寿螺不同部位组织碎片、不同性别及不同发育阶段样品的鉴别, 具有准确快速、灵敏高效的特点, 可用于植保检疫及食品安全部门福寿螺种类的检测。

关键词: 福寿螺; 特异性引物; 分子鉴别; 线粒体基因; 多重PCR

Multiplex PCR detection of alien invasive apple snails introduced to China

He Chao Yang Qianqian* Liu Suwen Liu Guangfu Yu Xiaoping*

(Zhejiang Provincial Key Laboratory of Biometrology and Inspection and Quarantine, College of Life Sciences, China Jiliang University, Hangzhou 310018, Zhejiang Province, China)

Abstract: To develop fast and accurate PCR-based diagnostic methods for three apple snail species, *i.e.* *Pomacea canaliculata*, *P. maculata* and a newly discovered species *Pomacea* sp., which are damaging crops seriously in China, the species-specific primers for the three species based on the divergent sequences of their whole mitochondrial genomes were designed and screened, and a multiplex PCR was established and the specificity and sensitivity of the primers were assessed. The results showed that the primers were of high specificity, which were able to amplify 1 238, 901, and 571 bp fragments from *P. canaliculata*, *P. maculata*, and *Pomacea* sp., respectively. No amplicon was observed from the negative control. The detective limitation was 1 ng genomic DNA of any of *P. canaliculata*, *P. maculata*, and *Pomacea* sp. in the PCR assay at 60℃ annealing temperature for 32 cycles. This multiplex PCR with species-specific primers could be applied to detecting tissue fragments and samples of both sexes at various developmental stages for assisting species detection of apple snails in plant protection, plant quarantine and food security.

Key words: apple snail; species-specific primer; molecular diagnosis; mitochondrial gene; multiplex PCR

福寿螺属 *Pomacea* 隶属于腹足纲新进腹足目瓶螺科, 是原产于南美洲亚马孙流域的一类大型淡水螺 (Cowie, 2002; 周晓农等, 2009)。多种福寿螺被

引入到东亚、东南亚、北美、欧洲及大洋洲的许多国家和地区, 有些种类成为严重的入侵性有害生物 (Hayes et al., 2009; Collier et al., 2011; Gilioli et al.,

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFF0210200), 国家自然科学基金(31800462)

* 通信作者 (Authors for correspondence), E-mail: yqq@cjlu.edu.cn, yxp@cjlu.edu.cn

收稿日期: 2018-07-09

2017)。入侵性福寿螺食性杂,可取食多种重要经济水生作物(Joshi & Sebastian, 2006; Dong et al., 2012);并通过竞争或捕食造成本地螺种的减少,严重破坏水生生态平衡(Kwong et al., 2009; 2010);此外,福寿螺是多种危险性寄生虫的中间寄主,特别是寄生能够引发人体嗜酸性脑膜炎的广州管圆线虫 *Angiostrongylus cantonensis*,其扩散速度和暴发范围直接影响寄生虫病的发病强度(Lv et al., 2009)。2000年,世界自然保护联盟入侵物种专家组将福寿螺列为世界100种最具威胁的入侵种之一(Lowe et al., 2000)。

福寿螺自1981年经我国台湾省引入内陆,迄今已入侵扩散30余年,成为南方水稻种植区的一大灾患(俞晓平等, 2001)。2003年,我国环保总局将福寿螺列入首批16种危害极大的外来入侵物种“黑名单”。据统计,我国每年有上百万公顷的稻田遭受福寿螺不同程度的为害,水稻单产减少可高达70%(章家恩等, 2010)。调研显示,福寿螺已迅速扩展到安徽、浙江、江西、湖南、四川、重庆、贵州、福建、云南、广西、广东、海南等省(区、市)并为害成灾。此外,受气候变化、种苗调运以及地域往来等影响,福寿螺在我国的扩散趋势加剧(Lv et al., 2011),今后仍将是我国必须应对的重大有害生物之一。

传统的福寿螺分类主要依靠形态学特征(Hayes et al., 2015)。然而,福寿螺属中存在多个形态近缘种,且种内具有较高的形态可塑性,难以实现种类的准确鉴定和鉴别(Berthold, 1991; Cowie & Thiengo, 2003)。在相当长的时间内,国内外研究认为入侵性福寿螺仅包括小管福寿螺 *P. canaliculata* 这一种,因而早期文献中常使用俗名如苹果螺、黄金螺、管福寿螺等特指小管福寿螺(Cowie, 2002; Hayes et al., 2015)。Rawlings et al. (2007)基于线粒体12S rDNA~16S rDNA及COI分子序列,首次揭示了外来入侵福寿螺除小管福寿螺外,还包括另外一个形态近似种孤岛福寿螺 *P. insularum*。直至2012年,Hayes et al. (2012)通过分子序列并结合成螺解剖学及卵的形态比较分析,将孤岛福寿螺归并为斑点福寿螺 *P. maculata* 的同物异名。在我国,宋红梅等(2010)通过线粒体COI序列分析,首次证实我国存在小管福寿螺和斑点福寿螺2个种;杨倩倩等(2016)基于线粒体COI序列分析检测到浙江省已有小管福寿螺和斑点福寿螺分布,且这2种福寿螺分别形成4种和2种单倍型;Lv et al. (2013)利用COI序列对我国54个福寿螺地理种群进行系统发育关系分析,揭示了我

国分布的福寿螺可能包含1个隐种;在此基础上, Yang et al. (2018)基于COI条形码技术的系统分析,明确了该隐种为我国分布的第3种入侵性福寿螺 *Pomacea* sp.。

准确的种类鉴别对于控制福寿螺的快速扩散、制定有效的防控措施具有重要意义。已有研究表明,线粒体COI条形码序列分析可以实现福寿螺种类的准确鉴别(Hayes et al., 2012; 杨倩倩等, 2016; Yang et al., 2018)。然而,序列分析耗时长且花费大,不能满足大量样本快速检测的需要。基于特异性引物的PCR方法无需测序即可实现对种的有效鉴别,具有准确、快速的优点,该方法已在多种类群中被广泛应用(Zhang et al., 2016; Zhao et al., 2016)。基于此,本研究利用GenBank中已公布的小管福寿螺、斑点福寿螺及新发现入侵种 *Pomacea* sp. 的线粒体全基因组数据,通过序列比对分析,在种间特异性区域设计特异性引物,建立一种可以同时检测这3种福寿螺的多重PCR方法,旨在为福寿螺的快速鉴定及防控提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

供试福寿螺样品:所用福寿螺成螺和卵块均为野外采集样本,于2014年7月至2015年11月采集自我国南方12个省(区、市)的17个地理种群,分别来自江苏省苏州市吴中区(JSWZ)、浙江省杭州市江干区(HZACA)、浙江省杭州市西湖区(HZXH)、浙江省宁波市余姚市(ZJYY)、江西省赣州市信丰县(JXGZ)、江西省上饶市信州区(JXSR)、湖南省长沙市望城区(CSQY)、四川省成都市锦江区(CDJJ)、四川省遂宁市船山区(SCSN)、重庆市合川区(CQHC)、贵州省贵阳市南明区(GZGY)、云南省大理州大理市(YNDL)、福建省福州市仓山区(FJFZ)、福建省厦门市同安区(FJXM)、广西壮族自治区南宁市西乡塘区(GXNN)、广东省广州市天河区(GDGZ)和海南省海口市美兰区(HNHK)的稻田、莲花池、河道、湖泊等淡水生境。活体样本于温度为 $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度为 $(60\pm 5)\%$ 、光周期为12 L:12 D的人工气候室饲养,每2 d投喂新鲜蔬菜大白菜、小白菜、茭白1次,每周换水1次,并收集卵块所孵化的幼螺备用;用于分子检测的样品液浸于95%乙醇中, -20°C 保存。在分子检测前先通过形态特征对3种福寿螺的成螺进行初步的形态鉴别。

试剂及仪器:血液/细胞/组织基因组DNA提取

试剂盒,天根生化科技(北京)有限公司;PCR反应试剂盒 R004A,日本 TaKaRa 公司;琼脂糖,西班牙 Biowest 公司;其余试剂均为国产分析纯。T100 型 PCR 仪,美国 Bio-Rad 公司;DYY-6C 型电泳仪,北京六一仪器厂;GeneGenius 凝胶成像分析系统,英国 Syngene 公司;ND-2000 超微量分光光度仪,美国 Thermo Scientific 公司。

1.2 方法

1.2.1 特异性引物的设计及筛选

从 GenBank 中下载小管福寿螺、斑点福寿螺和新发现入侵种 *Pomacea* sp. 的线粒体全基因组序列,序列号分别为 KJ739609、MF401379 和 KR350466,利用 Geneious R7 软件(Kearse et al., 2012)内置的 ClustalW Alignment 进行序列的多重比对。在序列变异区段分别设计特异性引物,引物设计遵循原则:1) 序列长度 20~25 bp;2) GC 含量为 40%~50%;3) 单条引物包含至少 3 个特异位点,以确保特异性;4) 1~2 个特异性位点位于引物的 3' 端。引物均由派森诺生物科技(上海)股份有限公司合成。

1.2.2 福寿螺 DNA 的提取

成螺组织的前处理:取活体成螺放置于 500 mL 烧杯底部,待螺腹足及头部伸出厣甲爬行时,用约 10 倍螺体积的沸水快速倒入烧杯中,轻轻晃动烧杯 3 min,然后将螺转移并浸没到 95% 乙醇中。此过程不仅有利于螺软体组织与螺壳的分离,也可去除螺表面的黏液,避免对后续 PCR 产生不良影响。取成螺腹足、外套膜、触角、雄螺阴茎鞘或雌螺卵黄腺 4 个不同部位组织,每个部位组织称取约 10 mg,用 75% 乙醇清洗 3 遍后置于干净滤纸上,待表面酒精挥发后转移至 1.5 mL 离心管中,加入适量液氮充分研磨。

幼螺的前处理:取孵化当天的幼螺,放置于 250 mL 烧杯底部,倒入约 50 mL 沸水杀死幼螺,使用 75% 乙醇漂洗 3 遍,待表面酒精挥发后转移至 1.5 mL 的离心管中,加入适量液氮充分研磨。

卵的前处理:使用 10% NaOH 溶液分离卵块中的卵粒,取单粒完整的卵,用灭菌水漂洗 2 遍,再用 75% 乙醇漂洗 1 遍,置于干净的滤纸上,待表面酒精挥发后转移至 1.5 mL 离心管中,使用移液器枪头将卵壳破碎,释放卵内组织液。本研究中从每个卵块中均只取单粒卵用于试验。

DNA 提取步骤参考 DNA 提取试剂盒说明书。每个样品分别获取 200 μ L 总 DNA 溶液,使用超微量紫外分光光度仪进行浓度及纯度的检测。

1.2.3 多重 PCR 反应体系的建立

利用所设计的特异引性物组构建多重 PCR 体系,分别以实验室纯化饲养的小管福寿螺、斑点福寿螺和新发现入侵种 *Pomacea* sp. 的基因组 DNA 为模板进行扩增。25 μ L 反应体系:Premix Taq™ 混合液(含 0.625 U TakaRa Ex Taq 酶、1 $\times$ Ex Taq 缓冲液、4 mmol/L Mg^{2+} 、0.4 mmol/L 四种 dNTP) 12.5 μ L、10 μ mol/L 引物各 1 μ L、模板 DNA 1 μ L,补 ddH₂O 至 25 μ L。PCR 扩增条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,设置退火温度梯度,分别在 56、58、60 $^{\circ}$ C 下退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s,32 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物在 1.0% 琼脂糖、1 $\times$ TAE 缓冲系统中电泳 35 min,每个孔加样 5 μ L,溴化乙锭染色后置于紫外凝胶成像仪中观察结果。各退火温度下分别重复 3 次试验,评价该方法对退火温度的敏感性并确定最佳退火温度。

1.2.4 多重 PCR 体系的评价方法

特异性评价:从采集自我国南方 12 个省 17 个地理种群中各选取 1~2 头成螺,分别提取其基因组 DNA,参考杨倩倩等(2016)方法扩增样品的 COI 条形码区段,以已发表的 3 种福寿螺的线粒体基因组中对应的区段为参考,使用 MEGA 6.0 软件计算 K2P 遗传距离,并以邻接法(neighbor joining, NJ)构建系统发育树,并自举检验 1 000 次。结合系统发育树和 K2P 遗传距离分析鉴别福寿螺种类。在上述试验基础上,利用 1.2.3 方法对不同地理种群的福寿螺基因组 DNA 样品进行多重 PCR 扩增,根据特异性条带的大小判定福寿螺种类。试验以灭菌 ddH₂O 为阴性对照,重复 3 次,结合 COI 条形码鉴别结果,评价多重 PCR 快速鉴别方法的特异性。

灵敏度评价:将提取的小管福寿螺、斑点福寿螺及新发现入侵种 *Pomacea* sp. 的基因组 DNA,经超微量紫外分光光度仪测定 DNA 浓度并调至 10 ng/ μ L,按照 10 倍梯度分别稀释为 1、0.1、0.01、0.001 ng/ μ L,5 个浓度的 DNA 各取 1.0 μ L 作为模版,按照 1.2.3 构建的多重 PCR 体系进行扩增,评价该方法的灵敏度,试验重复 3 次。

1.2.5 多重 PCR 的检测应用

选取实验室纯化饲养的小管福寿螺、斑点福寿螺和新发现入侵种 *Pomacea* sp. 成螺的腹足、外套膜、触角、雄螺阴茎鞘或雌螺卵黄腺 4 个不同部位组织、孵化 1 d 的幼螺及卵粒提取 DNA,以灭菌的 ddH₂O 为阴性对照,利用 1.2.3 方法进行多重 PCR 扩增,根据特异性条带的大小判定福寿螺种类。验证本研究

建立的多重PCR体系在不同部位组织碎片、不同性别及不同发育阶段的福寿螺样品检测中的应用。

对重庆华岩寺七步荷塘(放生池)采集的11个福寿螺样本(2头成螺和分别取自9个卵块的单粒卵)提取基因组DNA,依据建立的多重PCR反应体系进行检测。同时,将PCR产物进行测序,进一步验证检测结果,以验证本研究建立的多重PCR体系的鉴别准确性。

2 结果与分析

2.1 特异性引物的筛选

针对3种入侵性福寿螺的线粒体基因组序列,通

过Geneious R7软件比对和人工分析,共设计获得8对特异性引物。通过PCR筛选获取可用于鉴别小管福寿螺、斑点福寿螺和新发现入侵种*Pomacea* sp.的3对特异性引物,分别以3种福寿螺基因组DNA为靶标,特异地扩增出目的条带(表1)。其中引物PcF和PcR分别位于*cytb*和*nad4*基因上,理论上可以从小管福寿螺中扩增出1 238 bp的目的条带;引物PmF和PmR分别位于*COI*基因上,理论上可以从斑点福寿螺中扩增出901 bp的目的条带;引物NDF和NDR分别位于*nad1*和*nad6*基因上,理论上可以从新发现入侵种中扩增出571 bp的目的条带。引物对GC含量在44.0%~47.6%之间,熔解温度为53.8~57.9℃。

表1 多重PCR体系的特异性引物信息表

Table 1 The information of specific primers for the multiplex PCR assay

靶标种 Target species	引物 Primer	基因位置 Gene location	核苷酸序列 (5'-3') Nucleotide sequence (5'-3')	长度 Length (bp)	熔解温度 Melting temperature (°C)	GC (%)	扩增片段大小 PCR product size (bp)
小管福寿螺 <i>P. canaliculata</i>	PcF	<i>cytb</i>	CCTTGTTGTGTCTGTATTGG	20	54.4	45.0	1 238
	PcR	<i>nad4</i>	GGATGGAGGAGCATGAAATAG	21	55.7	47.6	
斑点福寿螺 <i>P. maculata</i>	PmF	<i>COI</i>	CTGATTGTTACCGCCTTCTT	20	57.9	45.0	901
	PmR	<i>COI</i>	CCCACTTAGAAGTGGAAATCAGTAG	25	56.0	44.0	
新发现的入侵福寿螺 Newly discovered <i>Pomacea</i> sp.	NDF	<i>nad1</i>	TACTTGCGTAGCAGAAACC	19	53.9	47.4	571
	NDR	<i>nad6</i>	GCCTGCCAATAAGCATATC	19	53.8	47.4	

2.2 多重PCR检测方法的建立

当退火温度设定为58℃和60℃时,利用多重PCR检测体系均可从小管福寿螺、斑点福寿螺和新发现入侵种*Pomacea* sp.中高效地扩增出目的片段;当退火温度为56℃时,多重PCR体系从小管福寿螺

中扩增出非特异性条带(图1)。表明退火温度在56℃及以下温度时有可能产生非特异性扩增,提高退火温度到58~60℃时,引物与目的种类特异性结合并扩增出明亮的目的条带。为保障多重PCR体系的特异性,以下检测中均以60℃为退火温度。

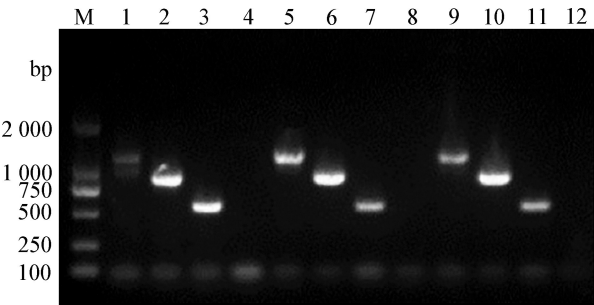


图1 不同退火温度下福寿螺的多重PCR体系扩增结果

Fig. 1 Amplification results of the multiplex PCR for apple snails in different annealing temperatures

M: DL2000 marker; 1~4: 退火温度为56℃; 5~8: 退火温度为58℃; 9~12: 退火温度为60℃; 1、5、9: 小管福寿螺; 2、6、10: 斑点福寿螺; 3、7、11: 新发现入侵种*Pomacea* sp.; 4、8、12: ddH₂O。M: DL2000 marker; 1~4: annealing temperature 56℃; 5~8: annealing temperature 58℃; 9~12: annealing temperature 60℃; 1, 5, 9: *P. canaliculata*; 2, 6, 10: *P. maculata*; 3, 7, 11: *Pomacea* sp.; 4, 8, 12: ddH₂O.

2.3 多重PCR体系的特异性

针对待检测的不同地理种群的福寿螺样品,扩增获取 658 bp 的 COI 条形码序列共计 21 条。系统发育树表明,其中 JSWZ4、HZXH7、JXGZ9、JXSR3、GZGY3、YNDL4、FJFZ5 这 7 个样品与小管福寿螺 (GenBank 登录号 KJ739609) 聚为一支 (Clade C); HZACA3、HZACA13、CDJJ5、CDJJ7、SCSN8、SCSN9、CQHC6a 这 7 个样品与斑点福寿螺 (GenBank 登录号 MF401379) 聚为一支 (Clade M); ZJYY3、

CSQY2、FJXM8、GXNN3、GDGZ5、GDGZ8、HNHK6 这 7 个样品与新发现入侵种 *Pomacea* sp. (GenBank 登录号 KR350466) 聚为一支 (Clade P) (图 2)。此外,3 个聚类分支中,各分支内序列间的遗传距离范围均小于 3.2%,3 个分支组间的平均遗传距离为 7.2%~11.3%。系统发育树结合遗传距离分析结果表明,Clade C 中的样品可鉴别为小管福寿螺,Clade M 中的样品可鉴别为斑点福寿螺,Clade P 中的样品可鉴别为新发现入侵种 *Pomacea* sp.。

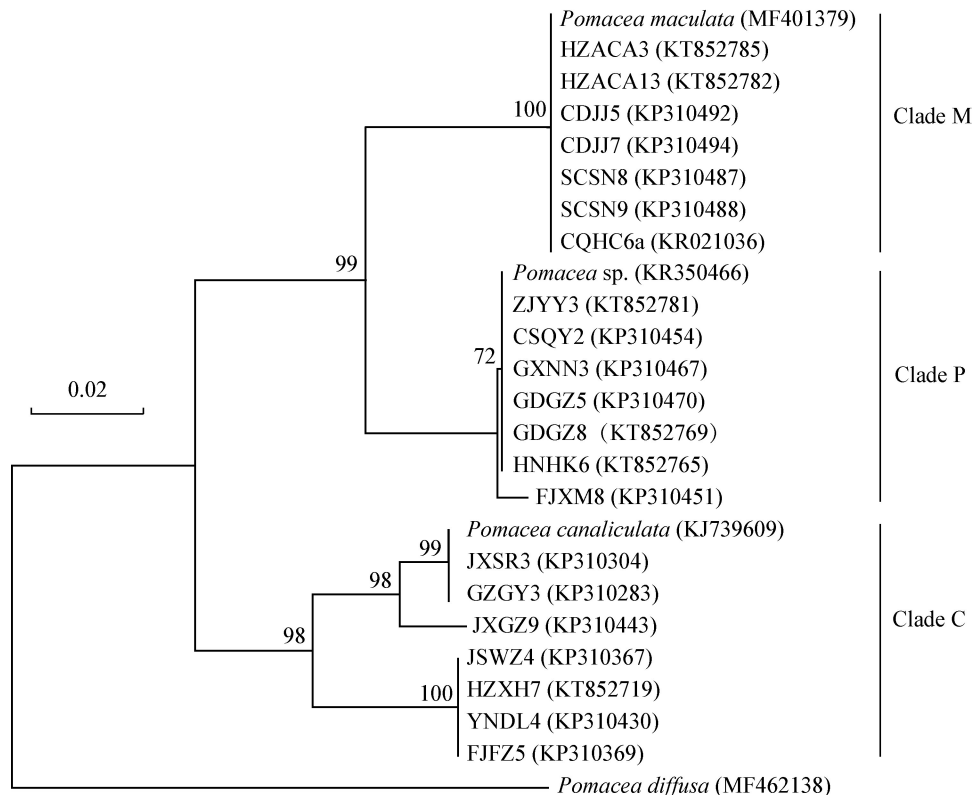


图2 基于 COI 条形码序列构建 3 种福寿螺的 NJ 系统发育树

Fig. 2 A neighbor joining phylogenetic tree based on COI barcoding sequences of three invasive *Pomacea* species

多重 PCR 检测结果表明,以小管福寿螺种群 JSWZ4、HZXH7、JXGZ9、JXSR3、GZGY3、YNDL4、FJFZ5 样品的 DNA 为模板时,扩增出一条 1 238 bp 的条带;以斑点福寿螺种群 HZACA3、HZACA13、CDJJ5、CDJJ7、SCSN8、SCSN9、CQHC6a 样品的 DNA 为模板时,扩增出一条 901 bp 的条带;以新发现入侵种 *Pomacea* sp. 种群 ZJYY3、CSQY2、FJXM8、GXNN3、GDGZ5、GDGZ8、HNHK6 样品的 DNA 为模板时,扩增出一条 571 bp 的条带(图 3)。所有样品均没有出现非特异性扩增,阴性对照未出现目的条带。表明该方法具有较强的特异性和准确性,能够区分不同地理种群的 3 种福寿螺。

2.4 多重PCR体系的灵敏度

在 3 种福寿螺种内,随着浓度的降低扩增产物的电泳条带分别依次呈减弱的趋势。反应程序设定在 32 个循环时,小管福寿螺、斑点福寿螺和新发现入侵种 *Pomacea* sp. 的 DNA 模板含量分别在 0.01、0.1 和 1 ng 时,均可扩增出特异性的目的条带,当小管福寿螺、斑点福寿螺和新发现入侵种 *Pomacea* sp. 的 DNA 模板含量分别降低到 0.01、0.1 和 1 ng 以下时无目的条带出现(图 4)。说明该方法检测不同种类的福寿螺时灵敏度均可达 1 ng 的 DNA 量。

2.5 多重PCR的检测应用

不同部位组织碎片、不同性别及不同发育阶段

的样品检测结果显示,该方法可以从小管福寿螺样品的DNA中扩增出一条1 238 bp的条带,从斑点福寿螺样品的DNA中扩增出901 bp的序列条带,从新发现入侵种 *Pomacea* sp. 样品的DNA中扩增出571 bp

的条带,阴性对照均无非特异性扩增(图5)。表明本研究所建立的特异性引物多重PCR方法不受样品发育阶段和性别的限制,可用于不同部位组织碎片的样品检测。

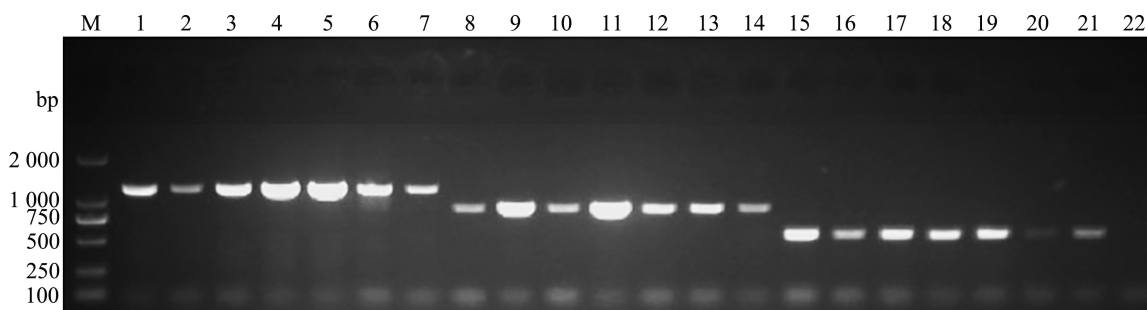


图3 多重PCR检测不同地理种群的3种福寿螺的特异性

Fig. 3 Specificity test of the multiplex PCR for the detection of various geographical populations of the three *Pomacea* species

1~7: 小管福寿螺; 8~14: 斑点福寿螺; 15~21: 新发现入侵种 *Pomacea* sp.。1~7: *P. canaliculata*; 8~14: *P. maculata*; 15~21: *Pomacea* sp. M: DL2000 marker; 1: JSWZ4; 2: HZXH7; 3: JXGZ9; 4: JXSR3; 5: GZGY3; 6: YNDL4; 7: FJFZ5; 8: HZACA3; 9: HZACA13; 10: CDJJ5; 11: CDJJ7; 12: SCSN8; 13: SCSN9; 14: CQHC6a; 15: ZJYY3; 16: CSQY2; 17: FJXM8; 18: GXNN3; 19: GDGZ5; 20: GDGZ8; 21: HNHNK6; 22: ddH₂O.

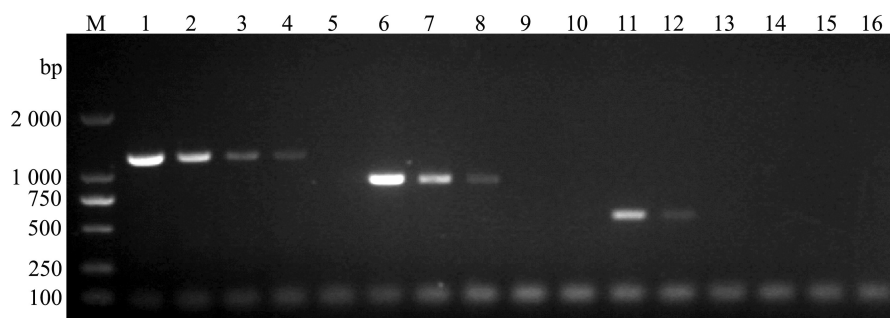


图4 多重PCR检测3种福寿螺的灵敏度

Fig. 4 Sensitivity test of the multiplex PCR for the three invasive *Pomacea* species

M: DL2000 marker; 1~5: 小管福寿螺; 6~10: 斑点福寿螺; 11~15: 新发现入侵种 *Pomacea* sp.; 1~5、6~10、11~15: DNA模板量依次为10、1、0.1、0.01、0.001 ng; 16: ddH₂O. M: DL2000 marker; 1~5: *P. canaliculata*; 6~10: *P. maculata*; 11~15: *Pomacea* sp.; 1~5, 6~10, 11~15: DNA template amounts of 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001 ng, respectively; 16: ddH₂O.

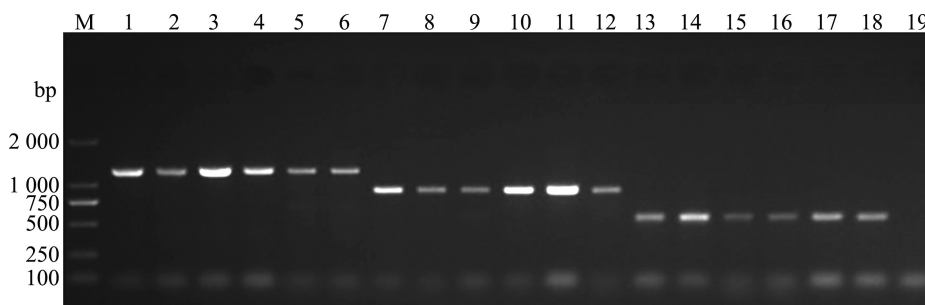


图5 不同部位组织、不同性别及不同发育阶段的福寿螺样品的多重PCR检测

Fig. 5 Detection of the tissues from different sections, different sexes and different developmental stages of

Pomacea species by using the multiplex PCR method

M: DL2000 marker; 1~6: 小管福寿螺(♂); 7~12: 斑点福寿螺(♀); 13~18: 新发现入侵种 *Pomacea* sp.(♂); 1、7、13: 腹足; 2、8、14: 外套膜; 3、9、15: 触角; 4、16: 阴茎鞘; 10: 卵黄腺; 5、11、17: 孵化1 d的幼螺; 6、12、18: 单粒卵; 19: ddH₂O. M: DL2000 marker; 1~6: *P. canaliculata* (♂); 7~12: *P. maculata* (♀); 13~18: *Pomacea* sp.(♂); 1, 7, 13: foot; 2, 8, 14: mantle; 3, 9, 15: tentacle; 4, 16: penis sheath; 10: vitelline gland; 5, 11, 17: one-day-old hatching; 6, 12, 18: single egg; 19: ddH₂O.

从重庆华严寺七步荷塘里采集的福寿螺 11 个样品中同时检测到小管福寿螺、斑点福寿螺及新发现入侵种 *Pomacea* sp., 这 3 种福寿螺可以通过扩增条带大小明显被区分, 其中 5 个样品 (2 个成螺和 3 个卵) 被鉴定为小管福寿螺, 4 个卵被鉴定为斑点福寿螺及 2 个卵被鉴定为新发现入侵种 *Pomacea* sp.

(图 6)。检测为阳性的特异性 PCR 产物经测序, 序列比对结果表明, 特异性扩增条带与 GenBank 中已报道的小管福寿螺、斑点福寿螺和新发现入侵种 *Pomacea* sp. 的对应区间同源性均在 99% 以上, 表明本研究所建立的多重 PCR 体系可用于 3 种福寿螺的同时快速检测。

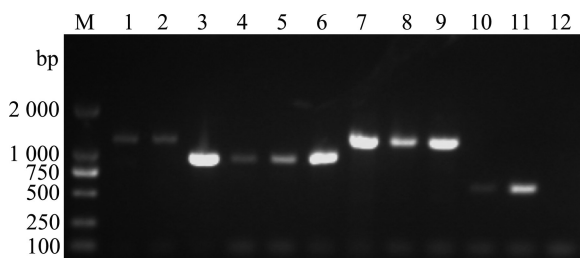


图 6 对重庆市华岩寺采集福寿螺样品的多重 PCR 检测结果

Fig. 6 Detection of the apple snail samples collected from Huayan Temple of Chongqing by using multiplex PCR

M: DL2000 marker; 1~2: 成螺; 3~11: 单粒卵; 12: ddH₂O. M: DL2000 marker; 1~2: adult snail; 3~11: single egg; 12: ddH₂O.

3 讨论

福寿螺属种类形态鉴定困难, 不仅受样品性别、发育阶段及完整性的限制, 而且对鉴定者专业的分类技能要求很高 (Cowie et al., 2006; Hayes et al., 2012)。近年来分子鉴定技术被应用到福寿螺种类的鉴定中, 极大地弥补了形态鉴定的缺陷, 具有准确、快速、不受生活史阶段限制等优点 (杨倩倩等, 2014)。福寿螺分子鉴定研究主要包括特异性引物扩增和序列分析 2 大类方法。其中, 基于序列分析的鉴定方法, 国内外学者开展了福寿螺线粒体 COI、12S rDNA、16S rDNA、atp6 等序列分析 (Rawlings et al., 2007; Hayes et al., 2012; Li et al., 2015)。特别是通过对 COI 条形码序列的研究, 不仅从小管福寿螺中鉴别出斑点福寿螺, 还从黄金福寿螺 *P. bridgesii* 中鉴别出神秘福寿螺 *P. diffusa* (Rawlings et al., 2007; Hayes et al., 2012)。我国发现的第 3 种入侵性福寿螺也主要是基于 COI 条形码序列分析所揭示 (Yang et al., 2018)。本研究所使用的不同地理种群福寿螺样本, 也是首先利用 COI 条形码序列分析确定种类, 在此基础上用于验证多重 PCR 中各引物对的特异性。基于序列分析的分子鉴定技术需经 PCR 扩增、测序和序列分析等流程, 一般需要 3~4 d 才可能得到结果, 而本研究所构建的特异性引物多重 PCR 技术, 根据电泳图谱即可直接判别 3 种入侵性福寿螺, 不仅简便、高效, 而且节约了测序所需的花费, 尤其适于大量样本的快速检测。

特异性引物 PCR 检测技术在福寿螺种类鉴定中取得了快速发展。Thaewnon-ngiw et al. (2004) 基于 16S rDNA 设计特异性引物, 实现了从 4 种瓶螺属 *Pila* 的泰国本土螺中快速鉴别小管福寿螺。多重 PCR 在普通 PCR 的基础上加以改进, 将多对特异性引物加入到 1 个 PCR 反应体系中, 可以针对多个 DNA 模板的多个目的片段进行扩增, 具有节省时间、降低成本、提高效率等优点 (Chamberlain et al., 1988)。Matsukura et al. (2008) 基于线粒体 COI 条形码区段设计了 2 条特异性上游引物, 与 1 条通用下游引物构建二重 PCR 体系, 用于小管福寿螺和斑点福寿螺的快速分子鉴别, 所设计的特异性引物 PCR 方法可以有效鉴别日本种群的 2 种福寿螺; 该方法已在许多福寿螺相关研究中被应用 (Andree & López, 2013; Hu et al., 2014; Yoshida et al., 2014)。Cooke et al. (2012) 在 Matsukura et al. (2008) 所构建二重 PCR 体系的基础上, 增加一条针对黄金福寿螺的特异性上游引物, 构建了针对小管福寿螺、斑点福寿螺和黄金福寿螺的三重 PCR 体系。本课题组通过序列比较和试验验证表明, Matsukura et al. (2008) 所设计的特异性引物并不能有效鉴别斑点福寿螺和 *Pomacea* sp., 当这 2 种福寿螺同时存在时, 该方法容易造成种类的误判。由于斑点福寿螺和 *Pomacea* sp. 的 COI 序列相似度较高 (Yang et al., 2018), 基于 COI 条形码区中变异信息很难挖掘出适于这 2 种福寿螺鉴别的特异性区段。为弥补这一缺陷, 本研究扩大用于比对的序列范围, 基于小管福寿螺、斑点福

寿螺和 *Pomacea* sp. 的线粒体全基因组分析设计了一组特异性引物对,通过多重PCR的方法实现了这3种入侵性福寿螺的快速鉴别。本研究首次实现了新发现入侵种福寿螺 *Pomacea* sp. 与近缘种的快速鉴别,对于明确 *Pomacea* sp. 在世界范围的分布及相关国家和地区对该种类的早期预警具有重要意义。

对我国不同种群福寿螺样品的检测结果表明,本研究构建的多重PCR鉴定方法具有较广泛的地理种群适用性;灵敏度检测试验证明,该多重PCR快速检测方法在32个循环时灵敏度可达1 ng 福寿螺基因组DNA,这在福寿螺基因组DNA提取中较容易实现。该技术适用于不同发育阶段、不同性别及不同部位组织碎片福寿螺样品的检测,对于植保检疫部门监测福寿螺的扩散速度、及时发现新定殖种群并制定合理的防控措施具有重要意义。此外,近年来一些商家用福寿螺冒充田螺的情况频繁被报道,因误食未完全煮熟的福寿螺而感染广州管圆线虫引发广州管圆线虫病的案例时有发生。该多重PCR鉴定体系适用于福寿螺主要食用部位腹足和外套膜组织的检测,可应用于食品安全部门对市场及餐馆中福寿螺的快速、准确鉴定。

参 考 文 献 (References)

- Andree K, López MA. 2013. Species identification from archived snail shells via genetic analysis: a method for DNA extraction from empty shells. *Journal of the Malacological Society of Australia*, 33(1): 1–5
- Berthold T. 1991. Vergleichende Anatomie, Phylogenie und historische Biogeographie der Ampullariidae (Mollusca: Gastropoda). *Abhandlungen des Naturwissenschaftlichen Vereins in Hamburg*, 29: 1–256
- Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE, Nguyen PN, Caskey CT. 1988. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Research*, 16(23): 11141–11156
- Collier KJ, Demetras NJ, Duggan IC, Johnston TM. 2011. Wild record of an apple snail in the Waikato River, Hamilton, New Zealand, and their incidence in freshwater aquaria. *New Zealand Natural Sciences*, 36: 1–9
- Cooke GM, King AG, Miller L, Johnson RN. 2012. A rapid molecular method to detect the invasive golden apple snail *Pomacea canaliculata* (Lamarck, 1822). *Conservation Genetics Resources*, 4(3): 591–593
- Cowie RH. 2002. Apple snails (Ampullariidae) as agricultural pests: their biology, impacts and management.//Barker G. *Molluscs as crop pests*. Wallingford, UK: CABI Publishing, pp. 145–192
- Cowie RH, Hayes KA, Thiengo SC. 2006. What are apple snails? Confused taxonomy and some preliminary resolution.//Joshi RC, Sebastian LS. *Global advances in ecology and management of golden apple snails*. Muñoz, Nueva Ecija: Philippine Rice Research Institute, pp. 3–23
- Cowie RH, Thiengo SC. 2003. The apple snails of the Americas (Mollusca: Gastropoda: Ampullariidae: *Asolene*, *Felipponea*, *Marisa*, *Pomacea*, *Pomella*): a nomenclatural and type catalog. *Malacologia*, 45(1): 41–100
- Dong SZ, Zheng GW, Yu XP, Fu CH. 2012. Biological control of golden apple snail, *Pomacea canaliculata* by Chinese soft-shelled turtle, *Pelodiscus sinensis* in the wild rice, *Zizania latifolia* field. *Scientia Agricola*, 69(2): 142–146
- Gilioli G, Schrader G, Carlsson N, van Donk E, van Leeuwen CHA, Martín PR, Pasquali S, Vilà M, Vos S. 2017. Environmental risk assessment for invasive alien species: a case study of apple snails affecting ecosystem services in Europe. *Environmental Impact Assessment Review*, 65: 1–11
- Hayes KA, Burks RL, Castro-Vazquez A, Darby PC, Heras H, Martín PR, Qiu JW, Thiengo SC, Vega IA, Wada T, et al. 2015. Insights from an integrated view of the biology of apple snails (Caenogastropoda: Ampullariidae). *Malacologia*, 58(1/2): 245–302
- Hayes KA, Cowie RH, Thiengo SC. 2009. A global phylogeny of apple snails: Gondwanan origin, generic relationships, and the influence of outgroup choice (Caenogastropoda: Ampullariidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 98(1): 61–76
- Hayes KA, Cowie RH, Thiengo SC, Strong EE. 2012. Comparing apples with apples: clarifying the identities of two highly invasive Neotropical Ampullariidae (Caenogastropoda). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 166(4): 723–753
- Hu YC, Mu XD, Luo D, Xu M, Yang YX, Gu DG, Luo JR, Zhang JE. 2014. Genetic variability of the invasive snail *Pomacea canaliculata* in South China based on mitochondrial 16S rDNA sequences. *Biochemical Systematics & Ecology*, 57: 203–209
- Joshi RC, Sebastian LS. 2006. *Global advances in ecology and management of golden apple snails*. Muñoz, Nueva Ecija: Philippine Rice Research Institute
- Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, Buxton S, Cooper A, Markowitz S, Duran C, et al. 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12): 1647–1649.
- Kwong KL, Chan RKY, Qiu JW. 2009. The potential of the invasive snail *Pomacea canaliculata* as a predator of various life-stages of five species of freshwater snails. *Malacologia*, 51(2): 343–356
- Kwong KL, Dudgeon D, Wong PK, Qiu JW. 2010. Secondary production and diet of an invasive snail in freshwater wetlands: implications for resource utilization and competition. *Biological Invasions*, 12(5): 1153–1164
- Li XY, Bian QQ, Zhao GH. 2015. Phylogenetic analysis of *Pomacea canaliculata* isolates collected from rice fields in different origins of China by combined mitochondrial 12S and 16S genes. *Mitochondrial DNA*, 26(1): 27–31
- Lowe S, Browne M, Boudjelas S, de Poorter M. 2000. 100 of the

- world's worst invasive alien species: a selection from the global invasive species database. Auckland, New Zealand: Invasive Species Specialist Group of the World Conservation Union
- Lv S, Zhang Y, Chen SR, Wang LB, Fang W, Chen F, Jiang JY, Li YL, Du ZW, Zhou XN. 2009. Human angiostrongyliasis outbreak in Dali, China. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 3(9): e520
- Lv S, Zhang Y, Liu XH, Hu L, Liu Q, Wei FR, Guo YH, Steinmann P, Hu W, Zhou XN, et al. 2013. Phylogenetic evidence for multiple and secondary introductions of invasive snails: *Pomacea* species in the People's Republic of China. *Diversity & Distributions*, 19(2): 147–156
- Lv S, Zhang Y, Steinmann P, Yang GJ, Yang K, Zhou XN, Utzinger J. 2011. The emergence of angiostrongyliasis in the People's Republic of China: the interplay between invasive snails, climate change and transmission dynamics. *Freshwater Biology*, 56(4): 717–734
- Matsukura K, Okuda M, Kubota K, Wada T. 2008. Genetic divergence of the genus *Pomacea* (Gastropoda: Ampullariidae) distributed in Japan, and a simple molecular method to distinguish *P. canaliculata* and *P. insularum*. *Applied Entomology & Zoology*, 43(4): 535–540
- Rawlings TA, Hayes KA, Cowie RH, Collins TM. 2007. The identity, distribution, and impacts of non-native apple snails in the continental United States. *BMC Evolutionary Biology*, 7(1): 97
- Song HM, Hu YC, Wang PX, Mou XD, Li XH, Wang XJ, Luo JR. 2010. Sequencing cytochrome oxidase subunit I of mitochondrial DNA and the taxonomic status of apples snails. *Chinese Journal of Zoology*, 45(1): 1–7 (in Chinese) [宋红梅, 胡隐昌, 王培欣, 牟希东, 李小慧, 汪学杰, 罗建仁. 2010. 福寿螺线粒体DNA COI基因序列测定及分类地位. *动物学杂志*, 45(1): 1–7]
- Thaewnon-ngiw B, Klinbunga S, Phanwichien K, Sangduen N, Lauhachinda N, Menasveta P. 2004. Genetic diversity and molecular markers in introduced and Thai native apple snails (*Pomacea* and *Pila*). *Journal of Biochemistry & Molecular Biology*, 37(4): 493–502
- Yang QQ, Liu SW, He C, Cowie RH, Yu XP, Hayes KA. 2018. Invisible apple snail invasions: importance of continued vigilance and rigorous taxonomic assessments. *Pest Management Science*, 16: doi: 10.1002/ps.5241
- Yang QQ, Liu SW, Ru WD, Liu GF, Yu XP. 2016. Molecular identification of invasive golden apple snails in Zhejiang Province based on DNA barcoding. *Biodiversity Science*, 24(3): 341–350 (in Chinese) [杨倩倩, 刘苏汶, 茹炜崧, 刘光福, 俞晓平. 2016. 基于DNA条形码技术对浙江省外来入侵福寿螺进行分子鉴定. *生物多样性*, 24(3): 341–350]
- Yang QQ, Wang ZL, Liu GF, Yu XP. 2014. Advance of molecular biology of invasive golden apple snails species in China. *Journal of China University of Metrology*, 25(2): 122–128 (in Chinese) [杨倩倩, 王正亮, 刘光富, 俞晓平. 2014. 我国外来入侵福寿螺分子生物学研究进展. *中国计量学院学报*, 25(2): 122–128]
- Yoshida K, Matsukura K, Cazzaniga NJ, Wada T. 2014. Tolerance to low temperature and desiccation in two invasive apple snails, *Pomacea canaliculata* and *P. maculata* (Caenogastropoda: Ampullariidae), collected in their original distribution area (northern and central Argentina). *Journal of Molluscan Studies*, 80(1): 62–66
- Yu XP, He TJ, Li ZF, Lü ZX, Sun LP, Zhu YH, Chen JM, Zheng XS, Xu HX. 2001. Occurrence of golden apple snails, *Pomacea canaliculata* (Lamarck), in paddy fields and its management. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 13(5): 247–252 (in Chinese) [俞晓平, 和田节, 李中方, 吕仲贤, 孙乐平, 朱亚红, 陈建明, 郑许松, 徐红星. 2001. 稻田福寿螺的发生和治理. *浙江农业学报*, 13(5): 247–252]
- Zhang JE, Zhao BL, Luo MZ, He MQ, Song CX. 2010. The ecological risk analysis and assessment on the invasion of golden apple snails. *Journal of Foshan University (Natural Science Edition)*, 28(5): 1–6 (in Chinese) [章家恩, 赵本良, 罗明珠, 何铭谦, 宋春秀. 2010. 外来生物福寿螺入侵的生态风险及其评价探讨. *佛山科学技术学院学报(自然科学版)*, 28(5): 1–6]
- Zhang T, Wang YJ, Guo W, Luo D, Wu Y, Kučerová Z, Stejskal V, Opit G, Cao Y, Li FJ, et al. 2016. DNA barcoding, species-specific PCR and real-time PCR techniques for the identification of six *Tribolium* pests of stored products. *Scientific Reports*, 6: 28494
- Zhao ZH, Cui BY, Li ZH, Jiang F, Yang QQ, Kučerová Z, Stejskal V, Opit G, Cao Y, Li FJ. 2016. The establishment of species-specific primers for the molecular identification of ten stored-product psocids based on *its2* rDNA. *Scientific Reports*, 6: 21022
- Zhou XN, Zhang Y, Lü S. 2009. Proposed Chinese name of *Pomacea canaliculata*. *Chinese Journal of Parasitology and Parasitic Diseases*, 27(1): 62–64 (in Chinese) [周晓农, 张仪, 吕山. 2009. “福寿螺”学名中译名的探讨. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 27(1): 62–64]

(责任编辑:李美娟)