

唐伟,朱治任,汪财生,等. 基于 *CO I* 基因的 DNA 条形码在鳖科动物鉴定上的应用[J]. 江苏农业科学,2017,45(6):30-36.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.06.006

基于 *CO I* 基因的 DNA 条形码 在鳖科动物鉴定上的应用

唐伟¹, 朱治任¹, 汪财生¹, 张明兴², 钱国英¹

(1. 浙江万里学院生物与环境学院, 浙江宁波 315100; 2. 余姚市明风淡水养殖场, 浙江宁波 315100)

摘要:为探讨 DNA 条形码在中华鳖不同地理群体鉴定上的可行性,以中华鳖 *CO I* 基因全长序列为对象设计通用引物,对中华鳖 6 个地理群体及鳖科不同属间进行了遗传多样性分析。结果发现,不同地理群体中华鳖的遗传距离在 0.020 3~0.041 7 之间,群体内平均遗传距离在 0.011 3~0.033 8 之间,种间与种内的遗传距离没有形成有效的条形码间隙,在基于个体遗传距离的 NJ 树上,各群体间的个体并没有形成有效的分支。在对鳖科不同属进行分析时发现属间及属内遗传距离形成了明显的差异间隙,在 NJ 树上,不同鳖按照属的特性分别进行聚类,并具有较高的节点支持率,聚类分析可信度高。因此,*CO I* 基因作为 DNA 条形码,能够有效地用于区分鳖科动物的不同属,但不适用于中华鳖地理群体的分离鉴定。

关键词: DNA 条形码; *CO I* 基因; 中华鳖; 地理群体; 鳖科

中图分类号: S932.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)06-0030-06

中华鳖 (*Pelodiscus sinensis*) 隶属于动物界 (Animalia) 脊索动物门 (Chordata) 脊索动物亚门 (Vertebrata) 爬行纲 (Reptilia) 龟鳖目 (Chelononia) 曲颈龟亚目 (Cryptodira) 鳖总科 (Trionychoidea) 鳖科 (Trionychidae) 中华鳖属 (*Pelodiscus*), 又称甲鱼、水鱼、王八等, 主要生活在淡水水域, 为水陆两栖型动物。中华鳖地理分布非常广泛, 在我国主要分布于长江及黄河流域等, 国外主要分布于越南、日本和朝鲜等地^[1]。一般认为, 中华鳖无明显的亚种分化, 但是存在很多地理变异, 如黄河流域的黄河群体、浙江省宁波市姚江流域的姚江群体等。我国因地域辽阔, 南北纬度差异大, 各地域的生态条件不尽相同, 所以, 中华鳖在不同的地域所形成的基本形态也不尽相同, 部分鳖经过人工的定向选育甚至还形成了新的品系, 如清溪乌鳖。为保证中华鳖养殖业的稳定、健康和持续发展, 进行良种选育以改善中华鳖苗种的质量极为重要, 同时, 通过有效的方法对不同地域中华鳖的种质进行鉴定和评价具有非常长远的意义。目前, DNA 条形码作为一种成熟的 mtDNA 分子标记, 已被广泛应用于物种的鉴定, 在龟鳖类^[2-6]、鱼类^[7-9]、鸟类^[10-11]、昆虫类^[12]、及甲壳动物^[13]等物种上均有相关报道, 但在中华鳖不同地理群体的研究上, 尚未见报道。

DNA 条形码是 Hebert 等于 2003 年利用线粒体细胞色素 C 氧化酶 I 亚基 (cytochrome C oxidase subunit I, *CO I*) 构建物种鉴别体系时首次提出的, 利用一段短的基因序列作标记对物种进行快速鉴定, 并以此建立生物物种的个体与 DNA 序列

一一对应的关系^[14]。Hebert 等比较分析了动物界 9 个门中 13 320 个同属不同物种的 *CO I* 基因序列, 发现种内的差异基本上小于 1%, 种间的差异一般大于 11.3%。因此, Hebert 提出, 应用 *CO I* 基因作为条形码进行物种鉴定时, 种间遗传距离应为种内遗传距离的 10 倍及以上, 种间遗传距离以 2% 为界^[15]。

本研究通过对中华鳖 6 个地理群体的 111 个个体线粒体 *CO I* 基因序列进行比对分析, 探讨 *CO I* 基因在中华鳖各群体间及群体内的序列变异, 并构建系统进化树, 进而检验 *CO I* 基因作 DNA 条形码在中华鳖群体鉴定上的有效性, 以期为中华鳖地理群体的鉴定提供依据。同时, 下载了鳖科不同属的其他鳖类的 *CO I* 基因序列, 进行综合比对, 探讨 DNA 条形码在鳖科属间鉴定的可行性。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验采集了不同地理群体的中华鳖 (其中, 姚江群体编号为 Y1~Y34, 日本群体编号为 R1~R21, 太湖群体编号为 T1~T17, 黄河群体编号为 HH1~HH6, 清溪乌鳖编号为 W1~W4 和 W6~W19, 清溪花鳖编号为 h1~h15), 并结合从 NCBI 上下载的相关鳖科动物 *CO I* 基因序列一起进行分析 (表 1)。其中, 印度鳖属的恒河鳖 (*Nilssonina gangeticus*)、印度孔雀鳖 (*Nilssonina hurum*) 及黑鳖 (*Nilssonina nigricans*) 的拉丁名与蓝色动物学网 (<http://www.blueanimalbio.com/reptile/gui/bie.htm>) 的命名有异, 此处不做更正, 均以下载序列的命名为准。

1.2 总 DNA 的提取

中华鳖解剖前先置于 0.05% 的高锰酸钾溶液中浸泡 10 min 杀菌后, 颈部放血处死, 按常规解剖步骤, 迅速取前腿肌肉, 用液氮研磨成粉末。称取 25~30 mg 研磨后的粉末, 装

收稿日期: 2016-01-29

基金项目: 浙江省宁波市科技局农业重大项目 (编号: 2013C11011);

浙江省宁波市科技创新团队项目 (编号: 2012B82016)。

作者简介: 唐伟 (1986—), 男, 广西桂林人, 硕士, 主要研究方向为中华鳖种质资源。E-mail: cltw2008@163.com。

通信作者: 汪财生, 高级实验师。主要研究方向为水产经济动物营养。E-mail: wangcaisheng@zww.edu.cn。

于 1.5 mL 灭菌离心管中,按样品信息编号,液氮速冻后于 -80 ℃ 保存。采用 OMEGA 公司的 Tissue DNA Kit 试剂盒提取中华鳖总 DNA (详见说明书)。用 1.5% 的琼脂糖电泳

检测 DNA 提取的质量,并用分光光度计检测其吸光度及浓度后,将符合要求的 DNA 溶液稀释成约 30 ng/μL,待用。

表 1 中华鳖样本信息及相关鳖科动物序列信息

种名	拉丁名	登录号	采集地点
姚江群体	<i>Pelodiscus sinensis</i> Yaojiang River strain		浙江省余姚市明凤淡水养殖场
日本品系	<i>Pelodiscus sinensis</i> Japanese strain		浙江省余姚市明凤淡水养殖场
太湖群体	<i>Pelodiscus sinensis</i> Taihu Lake strain		浙江省绍兴中亚工贸园有限公司
黄河群体	<i>Pelodiscus sinensis</i> Yellow River strain		浙江省绍兴中亚工贸园有限公司
清溪乌鳖	<i>Pelodiscus sinensis</i> Qingxi Wubie strain		浙江省清溪鳖业有限公司
清溪花鳖	<i>Pelodiscus sinensis</i> Qingxi Huabie strain		浙江省清溪鳖业有限公司
小鳖	▲ <i>Pelodiscus parviformis</i>	FR822601.1	
佛罗里达鳖	▲ <i>Apalone ferox</i>	JF700189.1	
恒河鳖	▲ <i>Nilssonina gangeticus</i>	KC311379.1	
中南半岛大鳖	▲ <i>Amyda cartilaginea</i>	KC311382.1	
印度孔雀鳖	▲ <i>Nilssonina hurum</i>	KC311383.1	
努比亚缘板鳖	▲ <i>Cyclanorbis elegans</i>	HQ329772.1	
塞内加尔缘板鳖	▲ <i>Cyclanorbis senegalensis</i>	HQ329773.1	
赞比亚圆鳖	▲ <i>Cycloderma frenatum</i>	HQ329774.1	
印度箱鳖	▲ <i>Lissemys punctata</i>	HQ329775.1	
缅甸箱鳖	▲ <i>Lissemys scutata</i>	HQ329776.1	
孔雀鳖	▲ <i>Nilssonina formosa</i>	HQ329779.1	
黑鳖	▲ <i>Nilssonina nigricans</i>	JN416994.1	
山瑞鳖	▲ <i>Palea steindachneri</i>	HQ329783.1	
鼋	▲ <i>Pelochelys bibroni</i>	HQ329784.1	
幼河斑鳖	▲ <i>Rafetus euphraticus</i>	HQ329786.1	
斑鳖	▲ <i>Rafetus swinhoei</i>	HQ329787.1	
砂鳖	▲ <i>Trionyx axenaria</i>	HQ116600.1	

注:▲标记的为从 NCB 上下载所得。

1.3 PCR 扩增和测序

采用 Primer Premier 6.0 结合 Oligo 7 软件,以中华鳖线粒体 *CO I* 基因全长序列为对象,设计通用引物 RC122 - F (5' - CCAGTGACTTTAACCCGTTGAT - 3') 和 RC122 - R (5' - GAGAAAGAAACATGAAGGTCATGTG - 3'),均由华大基因合成。

PCR 反应采用 50 μL 体系,包括 25 μL 康为 PCR Mix, 2 μL RC122 - F (10 μmol/L), 2 μL RC122 - R (10 μmol/L), 17 μL ddH₂O, 4 μL DNA 模板。PCR 反应程序:95 ℃ 3 min; 94 ℃ 30 s, 58 ℃ 30 s, 72 ℃ 90 s, 33 个循环;72 ℃ 7 min。扩增完成后,将 PCR 产物全部吸入到 1 × TBE 缓冲液配制的 1.5% 琼脂糖凝胶点样孔,用 100 V 恒压电泳检测,确认为所需目的条带,进行割胶及目的条带回收,低温保存送至华大基因进行双向测序。测序所用引物与 PCR 引物相同。

1.4 数据分析

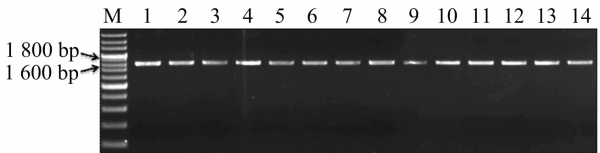
采用 Lasergene v5.0 软件^[16] 中的 SeqMan 工具及 CEx-press 软件,根据测序结果中的峰值,对测得的序列进行人工拼接。利用 Clustal X 1.85 软件^[17] 对测序所得序列进行排列比对,并辅助以人工校正;用 DNAsp 5.1 软件计算各群体的单倍型数、多态位点数、单倍型多样性指数 (H_d)、核苷酸多样性指数 (P_i)、平均核苷酸差异数 (K) 等参数;运用 DAMBE 软件^[18],以 TN93 模型校正距离为横坐标,转换和颠换数为纵坐标,做散点分布图,判断其散点变化趋势;将所有序列输入到 MEGA 6.0 软件中进行比对^[19],计算各群体的碱基含量比、碱

基转换及碱基颠换等参数,采用 Kimura 2 - parameter (K2p) 模型计算其遗传距离,并采用 Neighbour - Joining (NJ) 法构建系统进化树。

2 结果与分析

2.1 中华鳖 *CO I* 基因的序列测定

采用自主设计的通用引物 RC122 - F、RC122 - R,分别对不同地理群体中华鳖的 DNA 样品进行扩增后测序,所得序列确定为 *COI* 基因片段后,采用 Clustal X 及 MEGA 软件进行排比核对,截取同源长度的序列为 1 534 bp 的片段 (图 1)。由图 1 可知,扩增目的条带清晰、整齐,无其他非特异性杂带存在,并且测序时采用双向测序程序,保证了测序结果的准确性。



M—200 bp Marker; 1~14—中华鳖部分 *CO I* 样品
图1 中华鳖 *CO I* 基因扩增结果

2.2 基于 *COI* 基因对中华鳖不同地理群体的遗传多样性分析

将截取排比后同源长度相同的序列输入到 MEGA 6.0 软件中,以中华鳖 *CO I* 基因全长序列作参考,比对后发现,中华鳖 *CO I* 基因分为 2 个变异区间,靠近 5'端 400 ~ 700 bp 区

域为主要的变异区间,大部分变异位点都集中于此,此区域内的保守位点相对较少;靠近 3'端 850 ~ 1 250 bp 区域范围内,依稀存在部分变异位点,同时也包含大量保守位点区域。从 1 534 bp 的序列中,共检测到 928 个保守位点 (conserved sites, C)、337 个简约信息位点 (parsimony-informative sites, Pi)、606 个变异位点 (variable sites, V)、269 个自裔位点 (singleton site, S), 分别占整个序列的 60. 50%、39. 50%、21. 97%、17. 54%。统计碱基的组成发现,各碱基平均含量为 A = 30. 10%、T = 30. 27%、C = 23. 41%、G = 16. 22%, 其中 A + T 的含量 (60. 37%) 明显高于 C + G 的含量 (39. 63%), 表现出明显的线粒体基因 A + T 碱基偏好性。各群体间的碱基平均含量差异不大,其中碱基 A、T 的含量相当, G 的含量

最少。A + T 的含量在 3 个密码子位点中的含量均高于 G + C 的含量,其中以密码子第 3 位点的含量最高,达 70. 2%。

运用 DNA_{sp} 5. 1 软件分析不同群体中华鳖遗传多样性参数,结果 (表 2) 显示,112 个不同地理群体的中华鳖个体中,共检出了 133 个单倍型,其中姚江群体的最多,达 41 个,黄河群体仅 8 个。视 6 个地理群体中华鳖为一个总群体,则总群体的单倍型多样性指数 (H_d) 为 0. 973, 碱基多样性指数 (P_i) 为 0. 017 1, 平均核苷酸差异数 (K) 为 26. 314。姚江群体的单倍型多样性显示出最高水平,太湖群体和日本群体在单倍型多样性 (H_d)、碱基多样性指数 (P_i) 及平均核苷酸差异数 (K) 上总体显示出较为突出的遗传多样性,而黄河群体和清溪乌鳖则显示出较为贫乏的核苷酸多样性。

表 2 中华鳖各群体 CO I 基因遗传变异参数统计

群体	样本数	多态位点数	单倍型数	单倍型多样性 (H_d)	碱基多样性指数 (P_i)	平均核苷酸差异数 (K)
清溪花鳖	15	120	19	0. 975 ± 0. 012	0. 015 1 ± 0. 001 5	23. 154
黄河群体	6	26	8	0. 939 ± 0. 048	0. 005 4 ± 0. 000 9	8. 378
日本群体	21	254	21	0. 977 ± 0. 010	0. 027 9 ± 0. 002 7	42. 791
太湖群体	17	259	23	0. 980 ± 0. 010	0. 028 5 ± 0. 003 4	43. 836
清溪乌鳖	19	98	21	0. 976 ± 0. 009	0. 009 1 ± 0. 001 0	13. 965
姚江群体	34	216	41	0. 988 ± 0. 004	0. 016 8 ± 0. 001 5	25. 757

采用 MEGA 6. 0 软件,基于 Kimura - 2 - parameter (K2p) 模型计算中华鳖不同地理群体间的遗传距离,结果 (表 3) 显示,中华鳖不同地理群体间的遗传距离在 0. 020 3 ~ 0. 041 7 之间,其中遗传距离最大的为日本群体与清溪乌鳖,最小的为

日本群体与黄河群体。姚江群体与其他群体间的遗传距离均大于 0. 02。种内遗传距离在 0. 011 3 ~ 0. 033 8 之间,从大到小的顺序依次为清溪花鳖 > 清溪乌鳖 > 太湖群体 > 日本群体 > 姚江群体 > 黄河群体。

表 3 不同地理群体中华鳖基于 CO I 基因的种间、种内遗传距离

群体	种间遗传距离					种内遗传距离
	清溪花鳖	黄河群体	日本群体	太湖群体	清溪乌鳖	
清溪花鳖						0. 033 8
黄河群体	0. 031 7					0. 011 3
日本群体	0. 037 1	0. 020 3				0. 027 2
太湖群体	0. 032 3	0. 032 1	0. 037 1			0. 030 4
清溪乌鳖	0. 033 7	0. 036 4	0. 041 7	0. 031 6		0. 031 8
姚江群体	0. 026 0	0. 024 5	0. 022 9	0. 024 2	0. 025 7	0. 017 4

根据表 3 中中华鳖不同地理群体间的遗传距离,用 MEGA 6. 0 中的 NJ 程序,构建基于群体间遗传距离的系统进化树 (图 2),显示黄河群体与日本群体最先聚为一支,然后再

与姚江群体聚类,接着依次分别与清溪花鳖、太湖群体及清溪乌鳖聚类。姚江群体与黄河群体、日本群体有相对较近的亲缘关系,各群体中,黄河群体与日本群体间的亲缘关系最近。

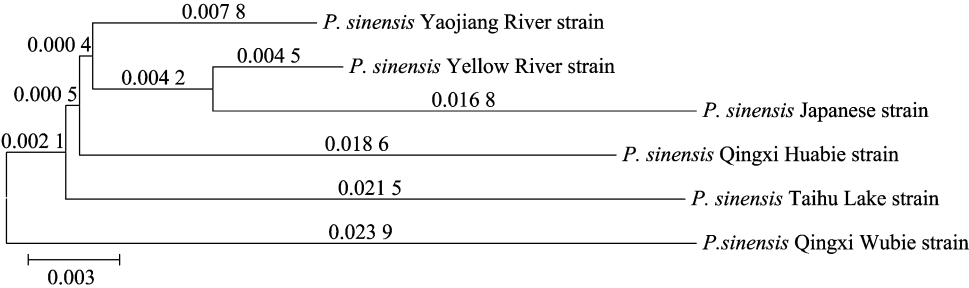
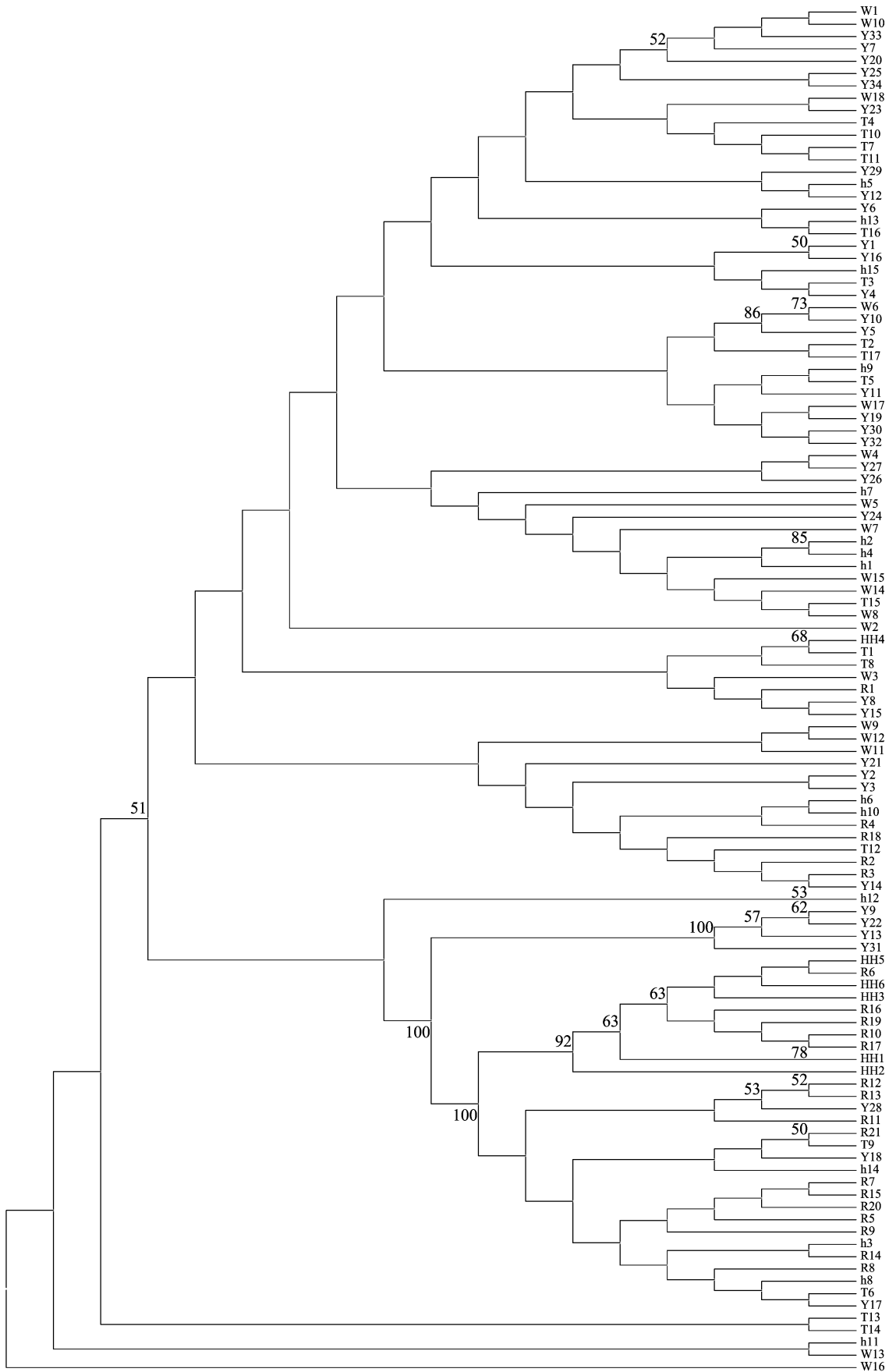


图2 基于群体间遗传距离构建的分子系统进化树

根据不同个体 CO I 基因序列信息,采用 MEGA 6. 0 软件基于 Kimura - 2 - parameter (K2p) 模型构建分子进化树 (图 3),由进化树可知,中华鳖各群体的个体散乱地聚于不同的分支,聚类不具有种的特性。

2. 3 基于 CO I 基因对鳖科动物不同属间的遗传多样性分析

本研究从 NCBI 上下载了与中华鳖同源性相近的其他鳖科动物的 CO I 基因序列 (表 1),用 Clustal X 1. 85 软件进行

图3 中华鳖各群体基于 *COI* 基因序列的 NJ 系统进化树

人工排比后,保留共有序列,最后所得片段长度为 650 bp。应用 MEGA 6.0 软件进行比对分析,结果显示,整个鳖科动物 *CO I* 基因碱基 A、T、C、G 的平均含量分别为 29.3%、29.3%、25.2%、16.3%,A + T 含量(58.6%)高于 C + G 的含量(41.5%),所有鳖科动物中,核苷酸 G 的含量均较低,低于 18%。统计各位点碱基使用情况,A - T 碱基在第 2 位密码子的使用量最高,为 73.1%,而 C - G 碱基在第 3 位密码子的使用量最高,为 50.4%,甚至超过了 A + T 的含量,表现出明显的碱基偏倚。

用 MEGA 6.0 软件,基于 Kimura - 2 - parameter 模型计算不同鳖科动物间的遗传距离,发现鳖科动物各种间的遗传距离在 0.013 1 ~ 0.268 8 之间,其中以黄河鳖与小鳖间的遗传距离最小,为 0.013 1,而努比亚缘板鳖(*Cyclanorbis elegans*)与清溪乌鳖间的遗传距离最大,达 0.268 8。中华鳖不同群体相互间的遗传距离在 0.013 1 ~ 0.048 3 之间,均低于 0.050。与中华鳖属遗传距离相对较近的为我国南方特有品种——砂鳖(*Trionyx axenaria*),其与中华鳖各地理群体的遗传距离在 0.048 7 ~ 0.066 9 之间。

利用 MEGA 6.0 软件中的 Tamura 3 - parameter mode (T92) + Gamma Distributed (G) 的组合模型进行计算,采用 NJ 法构建系统进化树(图 4),以 1 000 次自展分支检验(Bootstrap test)可靠性。由图 4 可知,不同鳖科动物按照其属的特

性相互聚类,其中,中华鳖属(*Pelodiscus*)的 7 个地理群体(姚江群体、清溪乌鳖、清溪花鳖、太湖群体、日本群体、黄河群体及小鳖)相互聚为一个支,节点支持率为 97%;鳖属(*Trionyx*)的砂鳖(*Trionyx axenaria*)独自占有一支,并与中华鳖属的分支聚在一起,节点支持率为 99%;山瑞鳖属(*Palea*)的山瑞鳖(*Palea steindachneri*)独自占有一支;印度鳖属(*Aspideretes*)印度孔雀鳖(*Nilssonina hurum*)及黑鳖(*Nilssonina nigricans*)相互聚类,节点支持率为 96%,并与缅甸孔雀鳖属(*Nilssonina*)的缅甸孔雀鳖(*Nilssonina formosa*)汇聚,然后再与恒河鳖(*Nilssonina gangeticus*)聚类,节点支持率为 95%,提示印度鳖属可能与缅甸孔雀鳖属同系。亚洲鳖属(*Amyda*)的中南半岛大鳖(*Amyda cartilaginea*)独为一支;斑鳖属(*Rafetus*)的幼河斑鳖(*Rafetus euphraticus*)和斑鳖(斯氏鳖)(*Rafetus swinhoei*)相互聚为一支,节点支持率为 92%;缘板鳖属(*Lissemys*)的印度箱鳖(*Lissemys punctata*)和缅甸箱鳖(*Lissemys scutata*)相互聚为一支,节点支持率为 95%;盘鳖属(*Cyclanorbis*)的努比亚盘鳖(*Cyclanorbis elegans*)和塞内加尔盘鳖(*Cyclanorbis senegalensis*)相互聚类,并与圆鳖属(*Cycloderma*)的赞比亚圆鳖(*Cycloderma frenatum*)聚为一个支。缘板鳖属、盘鳖属及圆鳖属 3 个属共同聚为一个支,节点支持率为 99%,提示这 3 个属间亲缘关系较近。

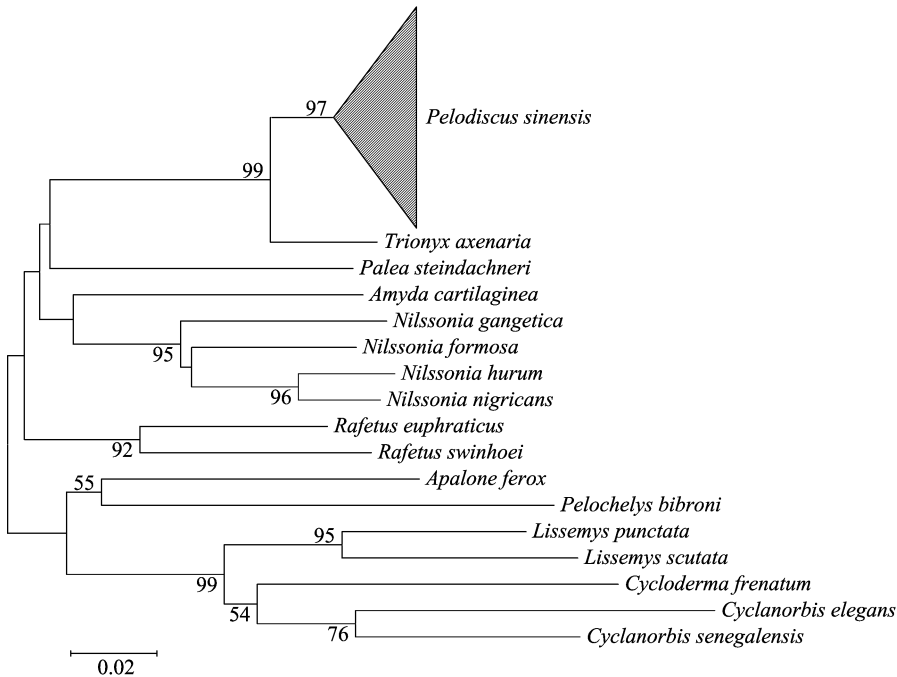


图4 基于鳖科动物 *CO I* 基因序列间遗传距离构建的 NJ 系统进化树

3 讨论

3.1 基于 *CO I* 基因对不同地理群体中华鳖的遗传差异性分析

6 个中华鳖地理群体中 *CO I* 基因序列的 A、T、C、G 碱基平均含量为 30.10%、30.27%、23.41%、16.22%,其中以碱基 G 的含量最低,这是线粒体 DNA 的一个显著特点^[20],A + T 的含量(60.37%)明显高于 C + G 的含量(39.63%),表现出明显的线粒体碱基偏好性。密码子各位点的 A + T 含量均

高于 G + C 的含量,其中以第 3 位点的含量最高,达 70.2%。Desalle 等指出,DNA 进化过程中,近缘物种间 DNA 编码区序列因较多发生同义突变,序列中转换发生的频率一般较颠换高^[21]。本研究中的转换/颠换比为 1.4,表明 *CO I* 基因序列的突变没有达到饱和,可以进行系统发育树的构建分析。

视 6 个地理群体中华鳖为一个总群体,则总群体的单倍型多样性指数为 0.973,碱基多样性指数为 0.017 1。Grant 等认为,当单倍型多样性 > 0.5,核苷酸多样性 > 0.005 时,则该物种具有相对较高的遗传多样性^[22]。由此可以看出,本研

究中的 6 个不同地理群体的中华鳖均具有较高的遗传多样性,这为我国中华鳖种质资源的保护奠定了基础。

在种群遗传距离分析上,杜启艳等认为,物种在科、属、种 3 个水平上遗传距离的差别若小于 2%,则可确定为同一物种^[23]。本研究,6 个不同地理群体中华鳖间的遗传距离在 2.03%~4.17% 之间,种间平均遗传距离为 2.58%,各群体间的遗传距离均大于 2%,其中黄河群体与日本群体间的遗传距离(2.03%)最小。Anderson 指出,物种在长期地理分隔以后,再发生杂交行为,可能会产生渐渗杂交的现象,从而降低物种的种间遗传距离^[24]。日本群体中华鳖是早年从我国引种过去,经过长期的性状改良,再从日本引入我国的一个地理群体,作为一个改良后的新品系,备受养殖户及消费者的喜爱,其养殖面积及区域也日益扩增,在养殖过程中难免存在与其他中华鳖群体杂交的情况,产生渐渗杂交的现象,从而造成其与黄河群体或其他群体间的遗传距离相对较小。因此,按照杜启艳等的标准^[23],本研究中的 6 个地理群体中华鳖均达到了种的分化水平。

3.2 *CO I* 基因作为 DNA 条形码在鳖类鉴定中的有效性分析

CO I 基因是线粒体基因组中常用的作为 DNA 条形码的标记基因^[25],其 5'端区域的一段序列既包含大量的保守区以进行通用引物的扩增,又包含有效的变异区可进行不同物种的区分,并且在大多数动物中,*CO I* 基因都存在显著的基因变异,因此,动物界中的物种鉴定通常选择 *CO I* 基因来作为 DNA 条形码^[7,14,26]。Hebert 等提出,利用线粒体 *CO I* 基因作 DNA 条形码对不同物种进行鉴定时,最关键的是种群的种间遗传距离必须大于种内遗传距离,并且差距在 10 倍及以上,其中种间的遗传距离以 2% 为界^[15]。

本研究对中华鳖不同地理群体进行遗传差异性分析时发现,种间遗传距离在 0.020 3~0.041 7 之间,均已达到 2% 以上种的分化水平,种内平均遗传距离在 0.011 3~0.033 8 之间,种间与种内的遗传距离并没有形成 10 倍的有效差异,相反,个别群体中,种内的平均遗传距离甚至大于种间,如清溪花鳖及日本群体。在基于个体 *CO I* 基因差异的 NJ 进化树上,相同群体的不同个体并没有按照种的特性进行聚类,而是零散地聚于各个分支,个别个体甚至单独成支。这可能与近缘物种的杂交有关。传统分类法通过斑点、体色等外部特征将中华鳖的不同地理群体区分开来。而中华鳖因相似的生活环境,缺乏有效的隔离机制,特别是近些年来,大量的引种、倒种及种间杂交,以期培育出优良性状(生长性能及表型性能)的品种,致使中华鳖不同群体间杂交紊乱,使得群体间基因的渗透概率较高。mtDNA 呈母系遗传,杂交子代的 mtDNA 几乎全都来自母本,而控制物种表型性状的基因可能来源于核 DNA。因此,基于 *CO I* 基因作 DNA 条形码对近缘杂交地理群体的鉴定可能存在一定程度的缺陷,需要结合核 DNA 的相关鉴定才能得到比较真实可靠的结果。根据种间与种内遗传距离差异度及进化树分析,本研究认为,*CO I* 基因不能将中华鳖的不同地理群体鉴定开来。

在对鳖科不同属间的遗传差异性分析时发现,属间遗传距离在 0.063 9~0.244 6 之间,属内平均遗传距离在 0.038 5~0.136 7 之间^[27],属间与属内之间形成了明显的差

异空隙,非常适用于 DNA 条形码的鉴别。在鳖科不同属的 NJ 进化树上,不同鳖按照属的特性分别进行聚类,并具有较高的节点支持率,聚类分析可信度高。因此,本研究认为,*COI* 基因作为 DNA 条形码,能够有效地用于鳖科不同属间的鉴定。

参考文献:

- [1] 周 婷. 中国龟鳖动物的分布[J]. 四川动物,2006,25(2): 272-276.
- [2] Lee J C I, Tsai L C, Liao S P, et al. Species identification using the cytochrome b gene of commercial turtle shells[J]. Forensic Science International: Genetics, 2009, 3(2): 67-73.
- [3] 吴 平, 徐璐珊. 中药材龟甲的分子鉴定研究[J]. 药学报, 1998, 33(4): 304-309.
- [4] Le M, Raxworthy C J, McCord W P, et al. A molecular phylogeny of tortoises (Testudines: Testudinidae) based on mitochondrial and nuclear genes [J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2006, 40(2): 517-531.
- [5] 辛翠娜, 王 莹, 彭建军, 等. DNA 条形码在龟鳖类物种鉴定中的应用[J]. 林业实用技术, 2010(4): 12-14.
- [6] 杜 鹤, 崔丽娜, 张 辉, 等. 鳖甲及其混伪品的 DNA 分子鉴定[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2011, 13(2): 429-434.
- [7] Ward R D, Zemlak T S, Innes B H, et al. DNA barcoding Australia's fish species [J]. Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences, 2005, 360(1462): 1847-1857.
- [8] Hubert N, Hanner R, Holm E, et al. Identifying Canadian freshwater fishes through DNA barcodes [J]. PLoS One, 2008, 3(6): e2490.
- [9] 柳淑芳, 陈亮亮, 戴芳群, 等. 基于线粒体 *CO I* 基因的 DNA 条形码在石首鱼科(Sciaenidae)鱼类系统分类中的应用[J]. 海洋与湖沼, 2010, 41(2): 223-232.
- [10] Kerr K C R, Stoeckle M Y, Dove C J, et al. Comprehensive DNA barcode coverage of North American birds [J]. Molecular Ecology Notes, 2007, 7(4): 535-543.
- [11] Hebert P D N, Stoeckle M Y, Zemlak T S, et al. Identification of birds through DNA barcodes [J]. PLoS Biol, 2004, 2(10): e312.
- [12] Hajibabaei M, Janzen D H, Burns J M, et al. DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103(4): 968-971.
- [13] Cywinska A, Hunter F F, Hebert P D N. Identifying Canadian mosquito species through DNA barcodes [J]. Medical and Veterinary Entomology, 2006, 20(4): 413-424.
- [14] Hebert P D N, Cywinska A, Ball S L. Biological identifications through DNA barcodes [J]. Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences, 2003, 270(1512): 313-321.
- [15] Hebert P D N, Ratnasingham S, de Waard J R. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species [J]. Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences, 2003, 270(Suppl 1): S96-S99.
- [16] Burland T G. DNASTAR's Lasergene sequence analysis software [J]. Methods in Molecular Biology, 2000, 132: 71-91.
- [17] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, et al. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25(24): 4876-4882.

高金秋,周建朝,王孝纯,等. 部分高抗低磷胁迫基因型甜菜 AFLP 指纹图谱的构建[J]. 江苏农业科学,2017,45(6):36-38.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.06.007

部分高抗低磷胁迫基因型甜菜 AFLP 指纹图谱的构建

高金秋^{1,2}, 周建朝², 王孝纯², 王艳², 沈萍²

(1. 白城师范学院, 吉林白城 137000; 2. 黑龙江大学农作物研究院, 黑龙江哈尔滨 150080)

摘要:利用 K-均值法和 AFLP 指纹图谱方法,对 40 个甜菜品种进行筛选和研究。结果表明,40 个甜菜品种可分为高抗低磷胁迫、低抗低磷胁迫和中抗低磷胁迫 3 大类。其中高抗低磷品种有 6 个、低抗低磷品种 12 个、中抗低磷品种 22 个。利用 64 对引物组合对引物及扩增条带数进行 K-值聚类分析,筛选出 E-ACC/M-CTT、E-ACG/M-CAA、E-ACG/M-CTA、E-ACG/M-CTT、E-AGC/M-CAG、E-AGC/M-CTA、E-AGC/M-CTT、E-ACT/M-CTT、E-AAG/M-CTT 9 对适合高抗低磷胁迫基因型甜菜特异引物,并扩增出 72 个差异条带。以上研究结果为更好地鉴定甜菜品种提供了参考依据。

关键词:甜菜;聚类分析;AFLP;指纹图谱

中图分类号:S566.301

文献标志码:A

文章编号:1002-1302(2017)06-0036-03

甜菜(*Beta vulgaris*),别称蒺菜,二年生草本,是除甘蔗外的主要糖源。近年来,很多研究都致力于发掘植物对磷的吸收、利用潜能,如小麦^[1]、玉米^[2]、大豆^[3]等。研究认为多项作物在受低磷胁迫时,会促进根、根表面积以及侧根形态指数的扩大^[4]。由于目前对甜菜品种的培育较多,利用指纹图谱对多个品种的鉴定及筛选有着显著意义。常用的 SSR^[5]、RAPD^[6]方法的检测位点有限,难以对品种大量鉴别,因此选用 AFLP 这种更可靠、更高效的方法构建指纹图谱。目前,对甜菜的研究大多集中于形态学中,但对于高抗低磷这类可广泛应用市场品种鉴定的指纹图谱少有报道。本研究将对 40 个甜菜品种进行聚类分析,选出高抗低磷的甜菜品种,并对其

进行 AFLP 指纹图谱构建,为我国甜菜品种种质的鉴别提供依据,为更广泛地应用提供有力的理论支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本试验于 2010 年 9 月至 2011 年 6 月在黑龙江大学进行。通过对 40 个品种的甜菜种子进行常规育苗,培养至子叶完全展开,获得 40 个子叶完全展开的甜菜品种作为试验对象。试验采用的甜菜品种及来源见表 1。

1.2 试验方法

1.2.1 试验设计 对 40 个品种的甜菜苗用半倍 Hoagland 营养液培养,并用浓度为 100 μmol/L 的高磷对 30 株苗进行处理,对另外 30 株用浓度为 1 μmol/L 进行低磷处理,并在出现真叶时进行数据采集。

DNA 提取:称取 0.1 g 粉末样品,加入 CTAB 提取液^[7]混匀,65 ℃水浴 30 min;加入 10 μL 10 mg/L 的 RNaseA,37 ℃水浴 20 min;加入 500 μL“酚:三氯甲烷:异戊醇=25:24:1”混合液混匀;12 000 r/min 离心 10 min;取上清液 700 μL 加入等体积的“三氯甲烷:异戊醇=24:1”混匀;12 000 r/min 离

收稿日期:2016-01-20

基金项目:国家现代农业产业技术体系建设项目(编号:CARS-210306);国家自然科学基金(编号:31371686、30471111);黑龙江大学科研计划。

作者简介:高金秋(1976—),女,山东单县人,硕士,讲师,主要从事植物生物技术方面研究。E-mail:wawa760824@126.com。

通信作者:周建朝,博士,研究员,主要从事植物营养与施肥技术的研究。E-mail:zhou88767@126.com。

[18] Xia X, Xie Z. DAMBE: software package for data analysis in molecular biology and evolution[J]. Journal of Heredity, 2001, 92(4): 371-373.

[19] Tamura K, Stecher G, Peterson D, et al. MEGA 6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0[J]. Molecular Biology and Evolution, 2013, 30(12): 2725-2729.

[20] Meyer A. Evolution of mitochondrial DNA in fishes[J]. Biochemistry and Molecular Biology of Fishes, 1993, 2: 1-38.

[21] Desalle R T, Freedman T, Prager E M, et al. Tempo and mode of sequence evolution in mitochondrial DNA of Hawaiian *Drosophila* [J]. Journal of Molecular Evolution, 1987, 26(1/2): 157-164.

[22] Grant W, Bowen B W. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation[J]. Journal of Heredity, 1998, 89

(5): 415-426.

[23] 杜启艳, 常重杰. DNA 条形码在鉴定物种中的应用[J]. 生物学教学, 2010, 35(12): 60-61.

[24] Anderson E. Introgressive hybridization[M]. New York: John Wiley and Sons, 1949.

[25] Simon P, Dupuis R, Costentin J. Thigmotaxis as an index of anxiety in mice. Influence of dopaminergic transmissions[J]. Behavioural Brain Research, 1994, 61(1): 59-64.

[26] Vences M, Thomas M, Bonett R M, et al. Deciphering amphibian diversity through DNA barcoding: chances and challenges[J]. Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences, 2005, 360(1462): 1859-1868.

[27] 唐伟. 姚江水系中华鳖种质特征研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2015.