

牛宝珍,李娜,刘艳红,等. 基于线粒体 *COI* 基因序列分析 5 个巨鲃群体的遗传多样性[J]. 江苏农业科学,2019,47(10):56–59.
doi:10.15889/j.issn.1002–1302.2019.10.012

基于线粒体 *COI* 基因序列分析 5 个巨鲃群体的遗传多样性

牛宝珍,李娜,刘艳红,王兴龙,陈春丽,文天仙,周亚,杜民

(红河学院云南省高校农作物优质高效栽培与安全控制重点实验室/红河学院生命科学与技术学院,云南蒙自 6611999)

摘要:采集云南省 5 个不同地域的巨鲃:红河曼耗(M)、怒江下游(N)、怒江坝(B)、澜沧江上游(L)、景洪(J)各 12 尾巨鲃共计 60 个样本进行 *COI* 基因克隆测序。结果表明,5 个巨鲃群体的 T、C、A、G 4 种碱基平均含量如下:怒江坝(B)群体 T、C、A、G 碱基含量分别为 27.4%、27.6%、28.0%、17.0%,景洪(J)群体 T、C、A、G 碱基含量分别为 27.4%、27.6%、28.0%、17.0%,澜沧江上游(L)群体 T、C、A、G 碱基含量分别为 27.4%、27.6%、28.0%、17.0%,红河曼耗(M)群体 T、C、A、G 碱基含量分别为 27.3%、27.6%、28.1%、17.0%,怒江下游(N)群体 T、C、A、G 碱基含量分别为 27.3%、27.6%、28.2%、16.9%;5 个巨鲃群体的 A+T 含量均大于 C+G 含量。用 MEGA 5.0 软件构建 5 个群体系统进化树显示景洪和红河曼耗聚为一支,澜沧江上游大多数个体单独聚为一支,怒江坝和怒江下游群体混合聚为一支;曼耗和景洪的群体间遗传距离(9.096)最大,本研究结果可为巨鲃的资源保护提供依据。

关键词:云南省;巨鲃;*COI* 基因;遗传多样性

中图分类号: S917.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002–1302(2019)10–0056–03

巨鲃(*Bagarius yarrelli*)分布于中国云南的怒江、澜沧江和元江水系,属于硬骨鱼纲(Osteichthyes)、鲇形目(Siluriformes)、鲇科(Sisoridae)、鲇属(*Bagarius*)^[1]。巨鲃是产地的主要食用鱼类^[2]。目前,对于巨鲃的研究主要包括巨鲃的生物学特性^[2]和野生巨鲃的生物学特性^[3]、食性^[4]、人工繁殖与胚胎发育^[5]和巨鲃细胞色素氧化酶基因多态性及系统进化的研究^[6]、巨鲃野生群体遗传多样性的 RAPD 分析^[7]、巨鲃线粒体 DNA *ND6* 基因克隆及多态性分析^[8]、巨鲃鱼线粒体 12S rRNA 和 16S rRNA 基因克隆及多态性分析^[9]。

随着分子生物学技术的不断进步,目前各种分子标记已被广泛应用于各种生物的分子系统分类和物种鉴定研究,其中线粒体 *COI* 基因序列是最常用的分子标记之一^[10]。Hebert 等提出了利用线粒体细胞 *COI* 基因的部分序列建立全球动物的 DNA 条码(DNA barcode)标准数据库,从而进行物种简单有效的识别和鉴定工作^[11]。区别于传统的形态学鉴定方法,DNA 条形码技术更加简单有效且不受人为和客观因素的影响,因为 DNA 条形码技术是直接利用碱基顺序来反映物种的客观指标,对于不同地域鱼类的遗传和进化关系的鉴定更为简单有效^[12]。单云晶等利用线粒体 *COI* 基因序列对 5 个不同的鲤养殖品进行遗传多样性分析^[13];曹艳等基于线

粒体 *COI* 基因序列对分布于渤海、黄海、东海和南海海域的 6 个群体蓝点马鲛遗传多样性进行了比较^[14];线粒体 *COI* 基因序列对于鸟类的系统分类也有很好的依据性,李涛等对雀科 13 属 36 种鸟类的 *COI* 基因部分序列初步分析了雀科鸟类之间的系统发育关系^[15];这些研究都表明线粒体 *COI* 基因序列对于物种的分类以及不同地理位置的同一物种的进化关系都是简单且有效的手段。由于现代工业化的加快,缺乏物种的保护,巨鲃鱼数量减少,已被列入云南省水生野生动植物保护名录^[16]。为保护巨鲃群体的多样性,对不同巨鲃群体在分子水平上进行遗传多样性研究,为今后建立基于 DNA 分子标记的巨鲃物种提供资料基础。本试验选来自澜沧江上游(L)、怒江坝(B)、红河曼耗(M)、景洪(J)以及怒江下游(N)不同群体的巨鲃作为试验材料,采用基因克隆方法获得线粒体 *COI* 基因全序列进行分析,构建系统进化树,探讨不同巨鲃群体的遗传和进化关系。

1 材料与方法

1.1 试验材料

选用 2013 年 10 月至 2017 年 6 月采自中国云南临沧市澜沧江上游(L)、西双版纳傣族自治州景洪市(J)、红河曼耗江段(M)、怒江傈僳族自治州怒江坝大桥(B)以及怒江傈僳族自治州三江口怒江下游(N)的巨鲃各 12 尾,依次编号为 1~12,取其背部肌肉组织放入 1.5 mL EP 管中并浸入无水乙醇,做好标记置于冰箱 -20 ℃ 保存。

1.2 试验方法

采用酚-氯仿方法^[13]提取巨鲃基因组 DNA,1% 的琼脂糖凝胶进行电泳检测后经凝胶成像系统进行拍照并保存在 -20 ℃ 冰箱。巨鲃 PCR 扩增所用的引物为杜民等^[17]设计合成的 1 对简并引物,其名称和序列分别为 Baya09F:5′-GA

收稿日期:2017–12–31

基金项目:国家自然科学基金(编号:31360638);云南省中青年学术带头人后备人才项目(编号:2015HB059);云南省教育厅科学研究基金重大专项(编号:ZD2013009);红河学院中青年学术带头人后备人才项目(编号:2014HB0203)。

作者简介:牛宝珍(1979—),女,湖北枣阳人,硕士,实验员,主要从事水生生物资源研究。E-mail:niu2011bao@126.com。

通信作者:杜民,博士,副教授,主要从事水生生物技术与资源研究。E-mail:du2005min@126.com。

GTGAAAAYCTCCTAGTCYCT-3', Baya09F; 5'-GTTTCTCATT AATWGAKCCTCC-3', 经过琼脂糖凝胶检测的目的 PCR 产物利用凝胶回收试剂盒(天根生化科技有限公司)回收、纯化、连接转化后,利用通用 M13 引物进行菌液 PCR 后将筛选后的阳性克隆样品送至上海生物工程有限公司进行测序。

1.3 数据处理

测序结果利用 DNAMAN 5.2.2 软件进行比对,采用 DnaSP 5.10.01 软件分析核苷酸序列,采用 MEGA 5.0 软件对序列的碱基含量、转换和颠换比分析并构建系统进化树。

2 试验结果

对测序的结果用 DNAMAN 5.2.2 软件对 60 个巨鲈的核苷酸序列进行比对并用 DNAsp^[18] 软件比对后发现在 5 个群体 60 个样本序列共存在 59 个单倍型,其中怒江下游 12 个序列存在 11 个单倍型,其余 4 个群体的 12 个序列均发现 12 个单倍型;利用 MEGA 5.0^[19] 软件中的 Kimura 双参数模型^[20] 分析 5 个巨鲈群体之间的碱基转换/颠换(R)的范围在 0.691~31.798,5 个群体之间碱基的平均转换/颠换比值范

围为 2.864~9.096。60 个体 *COI* 基因序列的全长为 1 551 bp,保守位点 1 144 个、变异位点 428 个、简约信息位点 267 个、单态突变位点 160 个。5 个巨鲈群体碱基组成百分比结果见表 1。

表 1 5 个巨鲈群体碱基组成

群体	碱基类型(%)					
	T	C	A	G	A+T	C+G
Baya B	27.4	27.6	28.0	17.0	55.4	44.6
Baya J	27.4	27.6	28.0	17.0	55.4	44.6
Baya L	27.4	27.6	28.0	17.0	55.5	44.5
Baya M	27.3	27.6	28.1	17.0	55.4	44.6
Baya N	27.3	27.6	28.2	16.9	55.5	44.5
总计	27.3	27.6	28.2	17.0	55.5	44.5

利用 MEGA 5.0 软件中 Kimura 2-parameter model 参数对本研究 5 个群体 60 个巨鲈 *COI* 基因核苷酸序列分别进行群体内和群体间的遗传距离分析,群体间平均遗传距离见表 2,右上角为转换+颠换(Ts+Tv),群体间平均遗传距离左下角为转换/颠换(Ts/Tv)。

表 2 5 个巨鲈群体间平均遗传距离以及群体内平均遗传距离

群体	群体间平均遗传距离					群体内平均遗传距离
	Baya B	Baya J	Baya L	Baya M	Baya N	
Baya B		0.089	0.061	0.082	0.019	4.629
Baya J	3.427		0.090	0.045	0.088	4.000
Baya L	4.642	4.320		0.074	0.062	2.697
Baya M	2.864	9.096	4.504		0.082	3.427
Baya N	5.647	3.522	5.441	2.965		6.718

本研究选择斑马鱼(*Danio rerio*)作为外群,NCBI 上面的登录号为 NC_002333。利用 5 个群体 60 尾巨鲈和斑马鱼基于 Kimura 双参数模型建立的最大似然法(Maximum Likelihood, ML)系统进化树见图 1。

3 讨论

3.1 巨鲈 *COI* 基因碱基组成

线粒体基因属母系遗传且稳定,线粒体 *COI* 基因既有足够的变异,又便于 PCR 扩增,使其成为 DNA 条形码基因之一^[21-22],利用其核苷酸序列的差异,可以进行物种鉴别、遗传及进化关系分析,被广泛应用于鸟类、鱼类、昆虫和动物的鉴别^[23]。本研究采用基因克隆测序方法比较了云南省内 3 个河流 5 个不同群体(M-红河曼耗、N-怒江下游、B-怒江坝、L-澜沧江上游、J-景洪),各 12 尾巨鲈共计 60 个样本的线粒体 *COI* 基因全长序列的碱基组成和单倍型进行分析。结果表明,巨鲈线粒体 *COI* 基因核苷酸序列长度为 1 551 bp,其保守位点 1 144 个、变异位点 428 个、简约信息位点 267 个、单一突变位点 160 个。5 个群体巨鲈 A+T 的含量(55.5%)明显高于 C+G 的含量(44.5%),G 含量(17.0%)最低,这与单云晶等的研究结果^[14]一致。从原核生物到真核生物,其 *COI* 基因组中碱基 A+T 高的现象广泛存在,这一现象的产生与基因长度以及密码子反密码子间结合能力的大小有关^[24]。

3.2 基于 *COI* 基因的不同巨鲈群体的亲缘关系

5 个群体中每 12 个个体中得到的单倍型除了怒江下游

(N)群体为 11 个单倍型外,其余 4 个群体各得到 12 个单倍型,60 个个体共得到 59 个单倍型,这可能是由于本试验利用的是 *COI* 基因的全长序列而不是特定的条形码所需的部分序列(648 bp)^[22];5 个群体的单倍型不存在共享的情况,表明 5 个巨鲈鱼群体的遗传多样性较高。不同群体的单倍型个体在系统进化树上交织在一起,其中怒江坝(B)群体和怒江下游(N)交叉最为严重,这一结果与董新培等在日本沼虾群体中的研究结果^[25]相一致。红河曼耗(M)群体和景洪(J)群体和另外其他 3 个不存在交叉情况,且红河曼耗(M)群体和景洪(J)群体的遗传距离较小。5 个群体中怒江坝(B)群体和怒江下游(N)群体聚为一支、红河曼耗(M)和景洪(J)聚为一支;澜沧江上游(L)单独为一支并且靠近怒江坝(B)和怒江下游(N)的分支,这可能与不同流域的基因交流有关系。巨鲈是分布在东南亚的越南、柬埔寨、缅甸、印度及中国云南的元江(红河)、澜沧江和怒江的底栖性鱼类,由于味道鲜美而受到当地居民的喜爱,本研究中的巨鲈 1 个群体来自红河的曼耗段(M),而红河最终经过中国的河口流向越南后最终到达北部湾,2 个群体来自澜沧江的澜沧县段(L,澜沧江上游)和景洪段(J),而最终经过缅甸、老挝、泰国、柬埔寨、越南后进入南海,2 个群体来自怒江的潞江坝段(B)和三江口段(N,怒江下游),怒江经由缅甸后流入印度洋;这样的地理状况为巨鲈群体间的基因交流提供了可能性。怒江坝、景洪、澜沧江上游、曼耗、怒江下游同一群体内的遗传距离分别为 4.629、4.000、2.697、3.427、6.718,以怒江下游群体内的遗传距离最大。遗传距离越大表明该群体内的遗传多样性越丰

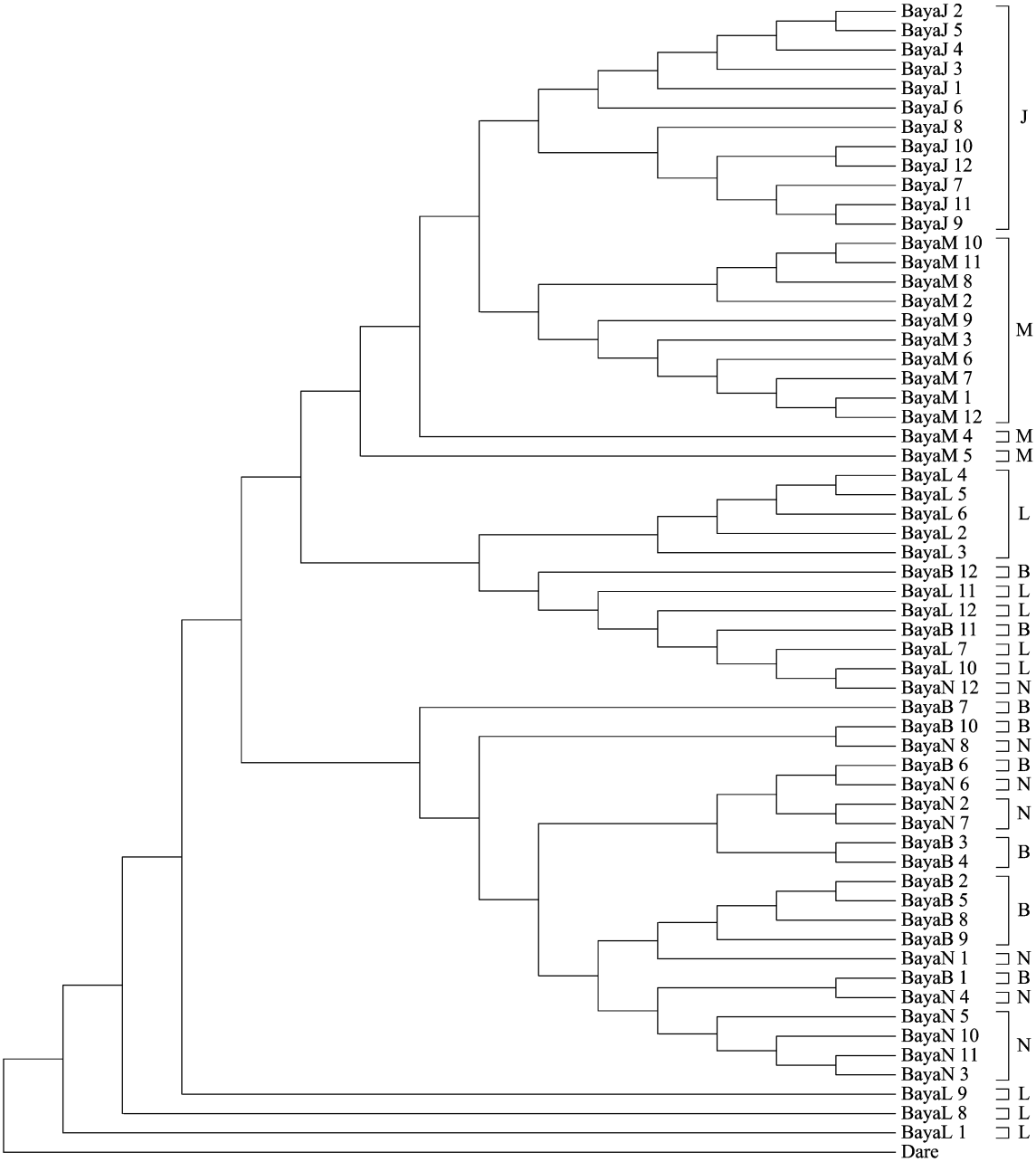


图1 基于 ML 法构建 59 个巨鲃 *COI* 基因单倍型的系统进化树

富,本研究中怒江下游群体的遗传多样性最丰富、怒江坝群体次之、澜沧江上游群体的遗传多样性最小。遗传多样性的丰富程度表明了这个生物群体对于外界环境的适应能力,本研究的结果可为巨鲃的遗传资源保护提供分子方面的依据。

参考文献:

[1]陈小勇. 云南鱼类名录[J]. 动物学研究,2013,34(4):281-337.
[2]田树魁,薛晨江,冷云,等. 巨鲃的生物学特性初步研究[J]. 水生态学杂志,2009,30(3):115-117.
[3]刘跃天,田树魁,冷云,等. 野生巨鲃生物学特性研究[J]. 现代农业科技,2010(18):302-303,307.
[4]冷云,田树魁,刘跃天,等. 巨鲃食性初步研究[J]. 现代农业

科技,2011(19):329-330.
[5]薛晨江,张正雄,马建颜,等. 巨鲃人工繁殖初报与胚胎发育观察[J]. 水生态学杂志,2012,33(5):54-56.
[6]杜民,牛宝珍,王婷婷,等. 巨鲃细胞色素氧化酶基因多态性及系统进化研究[J]. 上海海洋大学学报,2016,25(3):337-343.
[7]牛宝珍,杜民,刘艳红,等. 巨鲃线粒体 DNA *ND6* 基因克隆及多态性分析[J]. 江苏农业科学,2016,44(4):62-65.
[8]杜民,牛宝珍,贾梦应,等. 巨鲃线粒体 12S rRNA 和 16S rRNA 基因克隆及多态性分析[J]. 西南大学学报(自然科学版),2017,39(5):83-89.
[9]杜民,牛宝珍,罗彩艳,等. 巨鲃野生群体遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 淡水渔业,2015,45(1):15-19,24.
[10]肖武汉,张亚平. 鱼类线粒体 DNA 的遗传与进化[J]. 水生生物学报,2000,24(4):384-391.

侯宇奇,李贞景,翟雨佳,等. 蓖麻 GA20-氧化酶基因表达分析[J]. 江苏农业科学,2019,47(10):59-62.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.10.013

蓖麻 GA20-氧化酶基因表达分析

侯宇奇^{1,2}, 李贞景^{1,2}, 翟雨佳¹, 谢彩梅¹, 武淑芬^{1,2}, 王昌禄^{1,2}

(1. 天津科技大学新农村发展研究院,天津 300457;

2. 天津科技大学食品工程与生物技术学院/食品营养与安全教育部重点实验室,天津 300457)

摘要:为研究 GA20 氧化酶基因在蓖麻中的表达情况,以具有典型代表的 4 种高秆和 4 种矮秆蓖麻品种为材料,采用实时定量 PCR 和荧光定量 PCR 技术,对 GA20 氧化酶基因在蓖麻的不同器官及器官发育的不同阶段的表达特异性进行分析。结果表明,蓖麻的矮化不是由 GA20 氧化酶基因的突变所引起;GA20 氧化酶基因在种子和嫩叶中的表达量最高,在成熟叶中可大量表达,在茎中可微量表达,在根中可痕量进行表达;同一生长时期,高秆品种的 GA20 氧化酶基因表达量明显高于矮秆品种,不同生长时期高秆品种 GA20 氧化酶基因的表达量呈现由高到低再升高的变化趋势,而矮秆蓖麻 GA20 氧化酶基因的表达量始终处于相对较低水平。该研究结果为进一步阐明蓖麻 GA20 氧化酶基因的功能特征及揭示其参与调控植物生长的分子机制提供了参考。

关键词:GA20 氧化酶;RT-PCR;荧光定量 PCR;表达量

中图分类号:S565.601 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2019)10-0059-04

蓖麻(*Ricinus communis* L.)是一种经济潜力十分巨大的工业油料作物,是世界十大油料作物之一,具有极高的应用价值和巨大的经济前景^[1]。以蓖麻籽为原料生产的蓖麻油具有性能稳定、不易变性等特点,在极端温度环境下仍能保持原

有的燃烧特性。此外,蓖麻油是目前羟基脂肪酸的唯一来源^[2],以蓖麻油为基础原料的深加工产品多达 3 000 多种,广泛用于航空、纺织、环保、医药等领域^[3]。然而,我国主推种植的蓖麻品种绝大多数属高秆品种,因植株高大,单位面积单株数过少且抗倒伏性较差,使我国蓖麻种植面临的机械化收割困难和种植效益低下等问题日益突出,影响了农民种植蓖麻的积极性,使我国蓖麻原料的供应不足,成为严重制约我国蓖麻产业健康发展的瓶颈^[4]。

实践证明,矮化育种是解决蓖麻种植业发展瓶颈的有效途径之一。通过植株适当矮化,改善株型,增大群体结构,能够提高植物光合效率等能力^[5]。赤霉素(gibberellins,简称 GAs)是一类普遍存在于高等植物体内的类四环二萜羧酸,在

收稿日期:2017-10-28

基金项目:天津科技大学新农村发展研究院项目(编号:xnc201505);

天津市引智项目(编号:Y2012063)。

作者简介:侯宇奇(1993—),男,天津人,硕士研究生,研究方向为转基因蓖麻的培育及蛋白分析研究。E-mail:monkeygaara@163.com。

通信作者:王昌禄,教授,主要从事生物技术研究。Tel:(022)60601154;E-mail:clw123@tust.edu.cn。

[11] Hebert P N, Cywinska A, Ball S L, et al. Biological identifications through DNA barcodes[J]. Proc Royal Soc London B: Biol Sci, 2003, 270(1512): 313-321.

[12] 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.

[13] 单云晶, 鲁翠云, 李超, 等. 基于线粒体 COI 基因序列的 5 种鲤养殖品种遗传多样性研究[J]. 中国水产科学, 2013, 20(5): 931-938.

[14] 曹艳, 章群, 宫亚运, 等. 基于线粒体 COI 序列的中国沿海蓝点马鲛遗传多样性[J]. 海洋渔业, 2015, 37(6): 485-493.

[15] 李涛. 基于线粒体 COI 基因序列的雀科鸟类分子系统发育[D]. 西安: 陕西师范大学, 2008.

[16] 郑兰平, 陈小勇, 杨君兴. 澜沧江中下游鱼类现状及保护[J]. 动物学研究, 2013, 34(6): 680-686.

[17] Du M, Niu B Z, Jia M Y, et al. The complete mitochondrial genome of the bagarius yarrelli from honghe river[J]. Earth and Environmental Science, 2016, 41: 12-31.

[18] Librado P, Rozas J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data[J]. Bioinformatics (Oxford, England),

2009, 25(11): 1451-1452.

[19] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA 4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0[J]. Molecular Biology and Evolution, 2007, 24: 1596-1599.

[20] Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences[J]. Journal of Molecular Evolution, 1980(16): 111-120.

[21] Fedorov A, Saxonov S, Gilbert W. Regularities of context-dependent codon bias in eukaryotic genes[J]. Nucleic Acids Research, 2002, 30(5): 1192-1197.

[22] Tautz D, Arctander P, Minelli A, et al. DNA points the way ahead in taxonomy[J]. Nature, 2002, 418(6897): 479.

[23] 彭居刚, 王绪桢, 何舜平. DNA 条形码技术的研究进展及其应用[J]. 水生生物学报, 2008, 32(6): 916-919.

[24] 黄原. 分子系统学——原理、方法和应用[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998: 70-76.

[25] 董新培, 武小斌, 万海付, 等. 河北 3 个日本沼虾野生群体线粒体 DNA D-Loop 基因序列变异及种群遗传结构分析[J]. 水产学报, 2017, 41(2): 182-188.