

黄薇,刘兰英,罗土炎,等. 鳊鲴肠道微生物抗性基因组成特征的初步分析[J]. 江苏农业科学,2020,48(21):57-62.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.21.010

鳊鲴肠道微生物抗性基因组成特征的初步分析

黄薇,刘兰英,罗土炎,刘洋,宋永康

(福建省农业科学院农业质量标准与检测技术研究所/福建省农产品质量安全重点实验室,福建福州 350003)

摘要:肠道微生物是抗生素抗性基因(ARGs)的储存库,为明确 ARGs 在鱼肠道微生物中的组成特征,本研究以养殖鳊鲴为研究对象,利用高通量测序技术及功能宏基因组学分析方法对鳊鲴肠道微生物 ARGs 的种类和丰度进行了探究。研究结果显示,养殖鳊鲴肠道微生物主要由厚壁菌门(Firmicutes)、梭杆菌门(Fusobacteria)、变形菌门(Proteobacteria)和拟杆菌门(Bacteroidetes)组成,比对抗性基因数据库共注释得到 254 种 ARGs 基因,分别属于 24 类抗性类型,其中高丰度的抗性类型为多肽类抗生素、多重耐药、氟喹诺酮类、四环素类和 β -内酰胺类。以上结果表明,在鳊鲴养殖过程中,出现耐多肽类抗生素、氟喹诺酮类、四环素类、 β -内酰胺类以及多重耐药病原菌的机会相对较高。本研究为抗生素在鳊鲴养殖过程中合理使用提供参考依据,同时也显示宏基因组测序技术在检测鱼肠道 ARGs 的可行性和优越性。

关键词:鳊鲴;肠道微生物;抗生素抗性基因;宏基因组学

中图分类号: S182 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)21-0057-05

中国是水产养殖大国,水产养殖产量占世界养殖总产量的 70% 左右,位居世界第一^[1]。近年来,随着集约化水产养殖的迅速发展,水产养殖中的病害问题特别是细菌性病害在密集型的养殖体系中发病率极高,导致抗生素被大量过度使用。虽然抗生素具有杀菌、促进生长等作用,但长期重复使用或过度使用不仅会降低抗生素的药效,还有可能诱导产生一系列携带抗生素抗性基因(antibiotics resistance genes, ARGs)的耐药性菌株^[2]。ARGs 作为一项新型环境污染物在 2006 年被明确提出^[3],成为一个全球性的环境热点问题,由此而产生的潜在生态风险也日益引起各国政府和研究者的广泛关注。

水产养殖鱼类肠道和粪便内有耐药菌和 ARGs 检出的报道已屡见不鲜^[4]。动物肠道本身就是细菌生长繁殖的重要场所,肠道内共生着大量的已知和未知的微生物,环境中抗生素的选择压力容易诱

导其内在或外源 ARGs 通过质粒接合转移等方式传递给肠道内的大量敏感菌群变成新的耐药菌,因此鱼类肠道是 ARGs 定植和转移的一个非常理想的微环境^[5]。研究人员认为,鱼肠道为 ARGs 的转移和扩散提供了安全而稳定的场所可能是 ARGs 能够在水环境中长期稳定存在的重要原因^[6]。因此,明确养殖鱼体肠道菌群中 ARGs 的污染特征,对水产养殖环境 ARGs 的污染评价及生态安全管理具有重要的作用。

传统研究环境 ARGs 的方法主要是通过耐药菌的培养,以及 ARGs 的 PCR 和定量 PCR 筛选等,通过这些方法研究人员已经从不同环境介质中分离和鉴定了大量的 ARGs,阐释了不同 ARGs 的作用机制^[7]。但传统的研究分析方法具有一定的限制性,如大多的微生物不可培养、PCR 结果的真实程度取决于设计引物的序列等,因此很难得到环境中微生物抗生素抗性基因组的全面和详细的信息。近年来,基于功能的宏基因组筛选和基于高通量测序为基础的宏基因组测序分析技术与方法的发展为研究环境抗生素抗性基因组的生态、起源、进化和传播机制提供了强有力的工具^[8-9]。Looft 等^[10]和 Xiong 等^[11]对猪和肉鸡肠道微生物组的高通量宏基因组测序分析,使我们对猪和鸡的肠道微生物组所蕴藏 ARGs 的广度和深度都有了更进一步的理解,同时为微环境下 ARGs 的传播和流动提供了有力的

收稿日期:2020-06-20

基金项目:福建省自然科学基金(编号:2019J01101);福建省公益类科研院所专项(编号:2018R1018-1);福建省农业科学院英才项目(编号:YC2019011)。

作者简介:黄薇(1986—),女,江西抚州人,硕士,副研究员,主要从事水产微生物学研究。E-mail:lifehuangwei@aliyun.com。

通信作者:宋永康,研究员,主要从事水产动物营养研究。E-mail: songlibby@sina.com。

证据。然而与陆生脊椎动物相比,水生动物所处生态环境更为复杂,其肠道微生物具有更丰富的多样性和复杂性,受环境条件和随机因子的影响,使得鱼类肠道微生物比陆地动物更具动态性,直至目前鱼类肠道微生物 ARGs 组的相关性研究也鲜见报道。

鳊鱼(*Anguilla* sp.)是中国出口创汇最多的水产养殖品种之一,年产值超百亿元,是目前单项农产品中创汇最多的品种之一。鳊鱼在人工养殖过程中疾病时有发生,其中细菌性疾病的危害最为严重,常造成重大的经济损失。明确 ARGs 在鳊鱼肠道微生物中的组成特征,可以为指导鳊鱼养殖抗菌药物的合理使用提供必要的理论依据,对水产动物源病害防控具有重要的应用价值。本项目拟以养殖鳊鱼为研究对象,运用高通量测序技术及功能宏基因组学分析方法,确定鳊鱼肠道微生物中 ARGs 的种类和丰度,为鳊鱼的健康养殖、病害防控以及水生态环境调控参考依据。

1 材料与方法

1.1 样品采集

2019 年 3 月 12 日,选取福清鳊鱼养殖区的 3 个典型养鳊场作为采样点,每个养鳊场随机网捕 3 条鳊鱼,体质量 200 ~ 300 g,送回实验室。将采集的鳊鱼头尾固定,表面采用 75% 乙醇消毒 90 s,使用无菌去离子水冲洗 3 次,将每条鳊鱼用无菌刀解剖,取其肠道,立即放入含 15 mL PBS 缓冲液、1 mL 茶树油和 20 g 石榴石(0.7 mm)的无菌 50 mL 离心管中,用一次性无菌研杵压碎肠道,在涡流振荡器中以 1 500 r/min 的速度振荡 5 min 使其均匀化。将匀浆混合物依次通过 100、20、11 和 8 μm 的滤膜过滤,去除宿主细胞,再经过 0.22 μm 滤膜富集微生物,收集的肠道微生物滤膜储存在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下,以提取其总基因组 DNA。

1.2 主要试剂

75% 乙醇、PBS 缓冲液、无菌研杵,购自生工生物工程(上海)股份有限公司;茶树油、石榴石,购自德国 Qiagen 公司;100、20、11、8 和 0.22 μm 的滤膜,购自美国 Millipore 公司;PowerWater DNA Isolation Kit 试剂盒,购自美国 MOBIO 公司。

1.3 DNA 提取与纯化

取收集好的鳊鱼肠道微生物滤膜,采用 PowerWater DNA Isolation Kit 试剂盒提取总基因组

DNA,具体提取方法参考试剂盒说明书。提取的基因组 DNA 样品用 Qubit 2.0 核酸蛋白定量仪进行定量,然后放置在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下保存直至使用。

1.4 Illumina 测序及高通量数据处理

为达到测序要求的 DNA 阈含量,将 9 个 DNA 样品混合,由上海美吉生物公司采用 Illumina Hiseq 2500 测序平台进行宏基因组测序。高通量测序原始数据先采用 fastp 软件进行质控去除接头序列、低质量碱基、N 碱基及长度过短序列,利用 Megahit 与 Newbler 软件对质控数据进行多重混合拼接组装,使用 MetaGene 软件对拼接结果中的 Contigs 进行 ORF 预测,采用 CD-HIT 软件进行聚类(默认参数为:95% identity、90% coverage),每个类取最长的基因作为代表序列,构建非冗余基因集,使用 BLASTP 软件将非冗余基因集与 NR 数据库进行比对(比对参数设置期望值 $e\text{-value}$ 为 $1e-5$),并通过 NR 库对应的分类学信息数据库获得物种注释结果,然后使用物种对应的基因丰度总和计算该物种的丰度,从而构建相应分类学水平上的丰度表,将数据上传 ARDB 数据库(<http://ardb.cbcb.umd.edu/>)进行比对(比对参数设置期望值 $e\text{-value}$ 为 $1e-5$),获得基因对应的抗生素抗性功能注释信息;将数据上传 CARD 数据库(<http://arpcard.mcmaster.ca/>)进行比对(比对参数设置期望值 $e\text{-value}$ 为 $1e-5$),获得基因对应的抗生素抗性功能注释信息,综合 CARD 和 ARDB 的注释结果,绘制鳊鱼肠道微生物基因组抗性基因图谱。

2 结果与分析

2.1 高通量测序序列数据分析

鳊鱼肠道微生物基因组 DNA 样品经宏基因组测序共得到原始序列(Raw reads)50 839 026 条,质控后的有效序列(clean reads)50 355 024 条,占原始序列的 99.45%。混合拼接后得到 Contigs 65 048 条序列,N50 为 404 bp;经过基因预测得到 ORFs 的序列条数为 406 331,通过聚类构建了 200 260 个基因的非冗余基因集。

2.2 鳊鱼肠道菌群结构和多样性分析

利用 BLASTP 将非冗余基因集与 NR 数据库比对进行物种分类注释,共得到 71 个门水平、147 个纲水平、373 个目水平、686 个科水平和 1 473 个属水平和 4 094 个种水平的物种,其中注释为真细菌、病毒、古细菌、真核生物以及未分类物种的序列数

分别占总注释序列数的 96.13%、0.17%、0.04%、3.64% 和 0.02%。从注释结果中可知真核生物的序列数比例仅为 3.64%，说明本研究提取的鳗鲡肠道微生物基因组 DNA 样品基本清除了宿主 DNA。

从门水平上看，鳗鲡肠道微生物的优势菌群主要由厚壁菌门（Firmicutes）、梭杆菌门（Fusobacteria）、变形菌门（Proteobacteria）和拟杆菌门（Bacteroidetes）组成，其丰度分别占物种注释序列总数的 50.61%、29.31%、14.48% 和 1.23%，除此之外的其他门类的细菌在鳗鲡肠道样品中的丰度均较低（图 1）。从属水平上看，鳗鲡肠道微生物中相对丰度在 1% 以上的细菌属主要有乳球菌属 *Lactococcus*（46.49%）、鲸杆菌属 *Cetobacterium*（28.27%）、邻单胞菌属 *Plesiomonas*（11.59%）、气单胞菌属 *Aeromonas*（1.11%）（图 2）。上述结果使我们对鳗鲡肠道菌群多样性以及优势菌群结构组成有了更全面的认识。

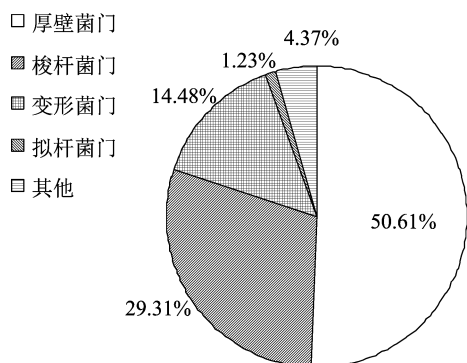


图1 基于门水平的鳗鲡肠道菌群组成分析

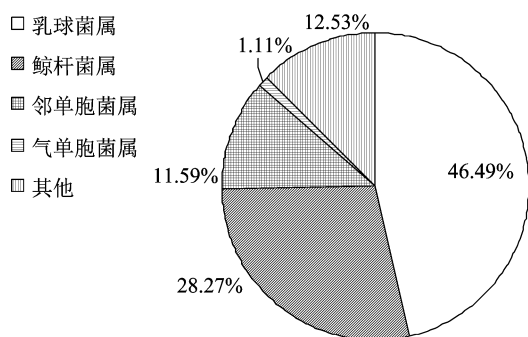


图2 基于属水平的鳗鲡肠道菌群组成分析

2.3 鳗鲡肠道微生物基因组抗性基因分析结果

将鳗鲡肠道微生物基因组数据上传 CARD 数据库进行 ARGs 的预测和注释。结果显示，鳗鲡肠道微生物基因组在 CARD 抗性基因数据库中共预测得到 669 852 条 ARGs 序列，分别属于 235 个不同

的 ARGs。不同抗性数据库的侧重点不同，所收录的 ARGs 序列数目、标准以及注释结果的筛选标准也不相同，导致不同数据比对和注释结果也不尽相同^[12]。基因组数据上传 ARDB 抗性基因数据库，共注释得到 27 736 条 ARGs 序列，得到 40 种 ARGs。本研究综合 CARD 和 ARDB 的注释结果，对鳗鲡肠道微生物的抗性基因类型进行了统计分析，结果见表 1。

由表 1 可知，鳗鲡肠道微生物中共存在 ARGs 基因 254 种，归属于 24 类抗性类型。具体包括 61 种多重耐药基因、46 种多肽类抗生素 ARGs、31 种氟喹诺酮类 ARGs、23 种四环素类 ARGs、25 种 β -内酰胺类 ARGs、6 种大环内酯类 ARGs、9 种林可酰胺类 ARGs、4 种利福平类 ARGs、1 种 Microcin J25 ARGs、5 种磷霉素类 ARGs、5 种 Elfamycin ARGs、3 种异烟肼类 ARGs、4 种链阳霉素 A ARGs、1 种螺旋霉素类 ARGs、8 种氯霉素类 ARGs、9 种氨基糖苷类抗生素 ARGs、3 种磺胺类 ARGs、1 种羰基氰化物间氯苯胺（CCCP）ARGs、1 种夫西地酸类抗生素 ARGs、1 种阿霉素 ARGs、4 种甲氧苄啶类 ARGs、1 种硝基咪唑类 ARGs、1 种莫匹罗星类 ARGs 和 1 种春雷霉素类 ARGs。统计结果表明，鳗鲡肠道微生物中存在种类多样且丰富的 ARGs 库。

在 CARD 的注释结果中，丰度最高的 ARG 为氟喹诺酮类抗性基因 *mfd*，丰度最高的抗性类型为多肽类抗生素；在 ARDB 注释结果中，丰度最高的 ARG 为四环素类抗性基因 *tetS*，丰度最高的抗性类型为四环素类。综合 CARD 和 ARDB 的注释结果，鳗鲡肠道微生物 ARGs 中较高丰度的抗性类型为多肽类抗生素、多重耐药、氟喹诺酮类、四环素类和 β -内酰胺类。表明在鳗鲡养殖过程中，出现耐多肽类抗生素、氟喹诺酮类、四环素类、 β -内酰胺类以及多重耐药病原菌的机会相对较高。

3 讨论

环境 ARGs 的种类和丰度与细菌群落结构组成密切相关^[13]。研究表明，不同菌种携带 ARGs 的偏好性不同，优势菌群对环境 ARGs 的组成特征扮演着重要角色^[14]。宏基因组测序方法不仅可以检测 ARGs 的广谱特征，同时还能检测出环境微生物群落结构组成。测序分析结果显示，鳗鲡肠道微生物中的优势菌群由厚壁菌门（Firmicutes）、梭杆菌门（Fusobacteria）、变形菌门（Proteobacteria）和拟杆菌

表 1 鳗鲡肠道微生物基因组中注释的抗生素抗性基因

| 抗生素抗性 | 抗性基因 | 序列数(条) | |
|----------------------|--|---------|--------|
| | | CARD | ARDB |
| 多肽类抗生素 | <i>Staphylococcus aureus</i> rpoC、 <i>Enterococcus faecium</i> cls、 <i>Staphylococcus aureus</i> cls、 <i>Staphylococcus aureus</i> pgsA mutations、vanT、D – Ala – D – Ala ligase、vanE、vanG、vanRA、vanRB、vanRD、vanRE、vanRF、vanRM、vanSC、vanSG、vanSM、vanHB、vanHD、vanHF、vanHO、vanYA、vanTE、vanTG、vanTN、vanWI、vanSI、vanRI、 <i>Bacillus subtilis</i> mprF、 <i>Brucella suis</i> mprF、 <i>Clostridium perfringens</i> mprF、 <i>Enterococcus faecium</i> liaR mutant、 <i>Enterococcus faecium</i> liaS mutant、bacA、rosA、rosB、LpxA、LpxC、PmrC、PmrE、PmrF、pmrA、PmrB、 <i>Pseudomonas</i> mutant PhoP、 <i>Pseudomonas</i> mutant PhoQ、bcrA | 119 356 | 6 432 |
| 多重耐药 | aadd、acrA、acrA、acrB、adeA、adeB、adeG、adeI、adeJ、adeS、blt、cmeA、CdeA、cmeB、CRP、emrD、emrY、 <i>Enterobacter aerogenes</i> acrR mutation、 <i>Enterococcus faecium</i> adeC、hp1184、mdfA、mdsC、mdtB、mdtC、mdtD、mdtF、mdtG、mdtH、mdtL、mel、mexB、mexF、mexH、mexK、mexN、mexQ、mexT、mexV、mexW、msbA、msrC、msrE、mtrA、oprA、oprN、qacH、robA、sav1866、smeD、smeE、smeR、tolC、fyuA、TriC、ErmG、clbA、CIPa、aph3iiiA、aac6ie、ermB、ermG | 86 754 | 622 |
| 氟喹诺酮类 | oqxA、oqxB、patA、patB、emeA、 <i>Staphylococcus aureus</i> gyrA、 <i>Salmonella</i> serovars gyrB、 <i>Salmonella enterica</i> gyrA、 <i>Escherichia coli</i> parE、 <i>Shigella flexneri</i> parC、 <i>Salmonella</i> serovars parE、 <i>Neisseria gonorrhoeae</i> parC、 <i>Ureaplasma urealyticum</i> gyrB、 <i>Haemophilus parainfluenzae</i> parC、 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> parE、 <i>Salmonella enterica</i> parC、 <i>Capnocytophaga gingivalis</i> gyrA、 <i>Bartonella bacilliformis</i> gyrA、 <i>Morganella morganii</i> gyrB、 <i>Campylobacter jejuni</i> gyrA、 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> gyrA、 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> gyrB mutant、 <i>Staphylococcus aureus</i> parE、 <i>Shigella flexneri</i> gyrA、QnrD2、QnrS9、QnrVC4、mfd、 <i>Escherichia coli</i> parC、 <i>Streptococcus pneumoniae</i> parC、pmrA | 89 616 | 3 872 |
| 四环素类 | tcr3、tet35、tet38、tet40、tet42、tetPA、tetE、tetG、tetL、tetR、tetX、tetT、tetS、tetB(P)、tetW、rpsJ、tetO、tetQ、tetM、tet44、tet36、tet32、tet34 | 60 940 | 16 082 |
| β – 内酰胺类 | blI_mox、bl2b_tem、bl2a_1、bl2a_iii、OXA – 136、OXA – 85、CARB – 7、OXA – 192、MOX – 7、OXA – 12、TLA – 1、BcII、CcrA beta – lactamase、ACT – 28、BLA1、TEM – 137、TEM – 19、mecC、mecB、 <i>Streptococcus pneumoniae</i> PBPIa、 <i>Streptococcus pneumoniae</i> PBP2b、 <i>Streptococcus pneumoniae</i> PBP2x、 <i>Neisseria meningitis</i> PBP2、 <i>Enterobacter aerogenes</i> omp36 mutants、 <i>Escherichia coli</i> ompF mutants | 59 920 | 136 |
| 大环内脂 | RlmA(II)、oleD、mefA、macB、carA、tlrC | 48 818 | 28 |
| 林可酰胺类 | linA、lnuA、lnuC、sala、lmrB、lmrC、lmrD、lsaA、lsaC | 41 466 | 74 |
| 利福平类 | rifampin phosphotransferase、 <i>Mycobacterium leprae</i> rpoB mutants、 <i>Staphylococcus aureus</i> rpoB mutants、 <i>Escherichia coli</i> rpoB mutants | 31 960 | — |
| Microcin J25 | YojI | 26 218 | — |
| 磷霉素 | <i>Mycobacterium tuberculosis</i> murA、FosC2、 <i>Escherichia coli</i> mutant murA、 <i>Escherichia coli</i> mutant GlpT、 <i>Escherichia coli</i> mutant UhpT | 20 218 | — |
| Elfamycin | <i>Escherichia coli</i> EF – Tu mutants、 <i>Enterococcus faecium</i> EF – Tu mutants、 <i>Clostridium difficile</i> EF – Tu mutants、 <i>Planobispora rosea</i> EF – Tu mutants、 <i>Streptomyces cinnamoneus</i> EF – Tu mutants | 16 280 | — |
| 异烟肼类 | <i>Mycobacterium tuberculosis</i> kasA mutant、 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> ndh mutant、 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> katG mutations | 14 742 | — |
| 链阳霉素 A | vgaALC、vgaB、vgaD、vgaE | 12 820 | — |
| 螺旋霉素类 | srnB | 8 386 | — |
| 氯霉素类 | catB6、catB8、catB9、catD、cmlv、catB10、cata8、cml_e3 | 8 048 | 74 |
| 氨基糖苷类 | acrD、adeR、kdpE、ANT(4′) – Ib、ANT(6′) – Ia、AAC(6′) – Ic – APH(2″) – Ia、APH(3′) – IIIa、 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> rpsL mutations、 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> tlyA mutations | 7 994 | 132 |
| 磺胺类 | <i>Escherichia coli</i> mutant folP、 <i>Streptococcus pyogenes</i> folP mutants、sulI | 4 920 | 52 |
| 羧基氰化物间氯苯 踪(CCCP) | emrB | 3 880 | — |
| 夫西地酸类 | fusB | 2 992 | — |
| 阿霉素类 | drnA | 1 656 | — |
| 甲氧苄啶类 | dfrC、dfrG、dfrE、dfrA3 | 1 630 | 20 |
| 硝基呋喃类 | <i>Escherichia coli</i> nfsA mutations | 1 008 | — |
| 莫匹罗星类 | <i>Bifidobacteria</i> intrinsic ileS | 230 | — |
| 春雷霉素类 | ksga | — | 212 |

门(Bacteroidetes)组成,这个结果与之前笔者所在课题组采用 16S rRNA 基因高通量测序分析得到的优势菌群^[15]是一致的,说明本研究的宏基因组测序结果可靠性较高。但 2 种研究方法得到的优势菌群的分布比例有较大差异,分析原因可能是不同的鳊鲃肠道样本的微生物菌群丰度本身就存在较大差异,同时也可能与不同基因组 16S rRNA 基因的 PCR 扩增的特异性有关。此外,鳊鲃肠道的优势菌门和优势菌属与已知斑马鱼^[16]、草鱼^[17]和虹鳟鱼^[18]的肠道优势菌群结果相似,说明鱼类肠道微生物的种类结构相似。

从 ARGs 注释结果可知,本研究共在鳊鲃肠道中检测出 254 种 ARGs,发现了许多在鱼类肠道未曾报道过的 ARGs,如 *thrC*、*YojI*、*emrB* 等。导致这些基因未曾报道的原因可能是由于这些基因的宿主(耐药菌)难以培养或是用于扩增这些基因的引物难以设计,这也进一步说明宏基因组测序分析方法比传统方法更能全面的检测出样品中的 ARGs^[19]。Tamminen 等在 6 年末使用过抗生素的水产养殖场中仍检测到 3 种编码四环素的 ARGs^[20]。本研究在鳊鲃肠道中,同样检测出了氯霉素类、硝基呋喃类、磺胺类、 β -内酰胺类以及人用抗生素等多种禁用渔药的 ARGs,由此可以说明水产养殖场已经成为环境中 ARGs 的储存库。某些 ARGs 一旦转移到病原菌中,将使鱼病治疗面临更多的新挑战,同时肠道中的细菌密度极高又极大地增加了基因横向转移的风险,这些 ARGs 可能通过多种途径(如食物链)最终传递到人体中。

鳊鲃肠道微生物中丰度最高的抗性类型为多肽类抗生素、多重耐药、氟喹诺酮类、四环素类和 β -内酰胺类。多肽类抗生素、氟喹诺酮类、四环素类和 β -内酰胺类均为水产养殖中常用的动保产品,尤其是多肽类抗生素,由于其添加在饲料中不影响适口性,对水产动物具有促生长、提高饲料转化率的效果,常常作为饲料添加剂广泛使用,大多数的种类都没有残留限量要求^[21]。在鳊鲃肠道中,检测出多重耐药基因 61 种,在 CARD 数据库比对结果中,这些多重耐药基因占 ARGs 基因总数的 12.95%,基因的多重耐药性已经在许多研究中被证实^[19]。抗生素的使用及残留的环境选择压力与抗生素抗性的产生密切相关^[3]。鳊鲃肠道中检测出丰度较高种类繁多的多重耐药基因可能与鳊鲃环境中使用的多种抗生素造成的微生物选择压力或

者细菌之间 ARGs 的交换有关^[22]。由此可知,水产养殖中抗生素的滥用和过度使用状况不容乐观。本研究采用宏基因组测序分析技术明确了鳊鲃肠道中 ARGs 的污染特征,可以为指导鳊鲃养殖抗菌药物的监管提供必要的参考依据,对水产动物源病害防控具有重要的应用价值,同时也表明宏基因组测序技术检测 ARGs 具有的可行性和优越性。

参考文献:

- [1] 张寿月,赵婉婉,吴伟. 水产养殖环境中抗生素抗性基因污染及其研究进展[J]. 中国农业科技导报,2015,17(6):125-134.
- [2] 李云莉,高权新,张晨捷,等. 养殖水域抗生素抗性基因污染的研究概况与展望[J]. 海洋渔业,2017,39(3):351-360.
- [3] Pruden A, Pei R T, Storteboom H, et al. Antibiotic resistance genes as emerging contaminants: studies in northern Colorado [J]. Environmental Science & Technology, 2006, 40(23):7445-7450.
- [4] Budiati T, Rusul G, Wan - Abdullah N W, et al. Prevalence, antibiotic resistance and plasmid profiling of *Salmonella* in catfish (*Clarias gariepinus*) and tilapia (*Tilapia mossambica*) obtained from wet markets and ponds in Malaysia [J]. Aquaculture, 2013, 372/373/374/375:127-132.
- [5] Van Reenen C A, Dicks L M. Horizontal gene transfer amongst probiotic lactic acid bacteria and other intestinal microbiota: what are the possibilities? a review [J]. Archives of Microbiology, 2011, 193(3):157-168.
- [6] 付佳伦. 细菌耐药基因在斑马鱼体内定植、转移规律及机制研究 [D]. 北京:中国人民解放军军事医学科学院, 2017.
- [7] 田宝玉,马荣琴. 环境微生物的抗生素抗性和抗性组 [J]. 中国生物工程杂志, 2015, 35(10):108-114.
- [8] Gupta S K, Padmanabhan B R, Diene S M, et al. ARG - ANNOT, a new bioinformatic tool to discover antibiotic resistance genes in bacterial genomes [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2014, 58(1):212-220.
- [9] Gibson M K, Forsberg K J, Dantas G. Improved annotation of antibiotic resistance determinants reveals microbial resistomes cluster by ecology [J]. The ISME Journal, 2015, 9(1):207-216.
- [10] Looft T T, Allen H K, Bayles D O, et al. In-feed antibiotic effects on the swine intestinal microbiome [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States, 2012, 109(5):1691-1696.
- [11] Xiong W, Wang Y L, Sun Y X, et al. Antibiotic-mediated changes in the fecal microbiome of broiler chickens define the incidence of antibiotic resistance genes [J]. Microbiome, 2018, 6(1):34.
- [12] 田容川,黄薇. 鸡肠道大肠杆菌多抗菌株 C20 耐药性基因的预测和分析 [J]. 福建农业学报, 2017, 32(9):932-938.
- [13] Guo J H, Li J, Chen H, et al. Metagenomic analysis reveals wastewater treatment plants as hotspots of antibiotic resistance genes and Mobile genetic elements [J]. Water Research, 2017, 123:468-478.
- [14] Wang J H, Lu J, Zhang Y X, et al. Metagenomic analysis of antibiotic resistance genes in coastal industrial mariculture systems

邓宽平, 杨秀伟, 杨胜伟, 等. 基于 SSR 标记的树莓资源遗传多样性分析[J]. 江苏农业科学, 2020, 48(21): 62–67.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.21.011

基于 SSR 标记的树莓资源遗传多样性分析

邓宽平¹, 杨秀伟¹, 杨胜伟¹, 杨选辉¹, 张永刚¹, 陈荣辉², 徐德林²

(1. 遵义市农业科学研究院, 贵州遵义 563000; 2. 遵义医科大学, 贵州遵义 563099)

摘要:为探索树莓种内个体之间和不同树莓品种间的遗传特性, 应用 SSR 标记开展树莓的遗传多样性分析。对引进、收集的树莓种质资源进行基因组 DNA 提取, 然后应用 PCR 扩增和 PAGE 电泳检测筛选材料间的多态性 SSR 标记, 利用 NTsys 2.10 e 软件进行遗传多样性分析。结果表明, 从 75 对 SSR 标记中筛选出 22 对多态性良好的标记引物, 共扩增得到 285 个条带, 引物扩增出的清晰条带数为 7~25 个, 平均每对引物的多态性比率为 96.8%。对引物的扩增结果进行聚类分析发现, 树莓样品在遗传系数为 0.71 的水平上共聚类为两大类群, 第一类包括 21 份树莓样品, 其中除 sm46、sm85、sm102 从辽宁省农业科学院引种外, 其余树莓样品均来自贵州省, 从辽宁省农业科学院引种的 22 份树莓样品, 除上述归为第一类的 3 份外, 其余的与贵州省遵义市习水土城、贵州省雷山县永乐、从广东省引种的树莓样品归为第二大类。45 份树莓具有较丰富的遗传多样性, 筛选出的 SSR 可有效应用于贵州省树莓品种的遗传多样性研究。

关键词:树莓; SSR 标记; 种质资源; 遗传多样性; 聚类分析

中图分类号:S663.202 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2020)21-0062-06

树莓 (*Rubus corchorifolius* L.), 别称悬钩子、托盘、马林等, 为蔷薇科 (Rosaceae) 树莓属 (*Rubus*, 别称悬钩子属) 的多年生灌木浆果类植物, 其果实具有外观鲜艳、口感细腻、风味芳香等特点, 除用作生

食果品外, 还可加工制成果酱、果酒、果汁、果冻、果羹及蜜饯等食品。此外, 树莓还是药用植物, 果实、茎、根皆可入药, 主要功效为醒酒、止渴、止血、解毒、镇痛等。树莓属植物在我国 27 个省 (自治区) 均有分布, 并以西南地区分布最为集中, 其中分布最广泛的省份是贵州省、云南省、四川省、广西壮族自治区、广东省、福建省, 其次为湖南省、湖北省及西藏自治区、陕西省、甘肃省等^[1-3], 且是贵州省山地农业开发的重要经济作物。

我国约在 20 世纪 80 年代开始大面积栽培树莓, 但品种选育工作尚处于起步阶段, 再加上树莓育种过程中, 会受到多倍体、无融合生殖、花粉不亲和、种子发芽率低等遗传问题的影响^[4-5], 树莓育种

收稿日期: 2020-01-30

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 31560079, 31960074); 贵州省科技支撑计划 (编号: 黔科合支撑 [2018] 2281); 贵州省中医药、民族医药科学技术研究专项 (编号: QZYY-2019-060); 贵州省中药材现代产业技术体系建设项目 (编号: GZCYTX-02)。

作者简介: 邓宽平 (1976—), 男, 贵州遵义人, 硕士, 副研究员, 研究方向为中药材资源保存评价利用。E-mail: dkp2003@126.com。

通信作者: 杨胜伟, 硕士, 农艺师, 研究方向为药用植物遗传育种及生理生化。E-mail: 1060299330@qq.com。

[J]. Bioresource Technology, 2018, 253: 235–243.

[15] Huang W, Cheng Z, Lei Shao Nan, et al. Community composition, diversity, and metabolism of intestinal microbiota in cultivated European eel (*Anguilla Anguilla*) [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2018, 102(9): 4143–4157.

[16] Roeselers G, Mitte E K, Stephens W Z, et al. Evidence for a core gut microbiota in the zebrafish [J]. The ISME Journal, 2011, 5(10): 1595–1608.

[17] Wu S, Wang Guitang, Angert E R, et al. Composition, diversity, and origin of the bacterial community in grass carp intestine [J]. PLoS One, 2012, 7(2): e30440.

[18] Wong S, Waldrop T, Summerfelt S, et al. Aquacultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) possess a large core intestinal

microbiota that is resistant to variation in diet and rearing density [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(16): 4974–4984.

[19] 赵帝, 徐在言, 吴山功, 等. 草鱼肠道微生物抗生素抗性基因研究 [J]. 水生态学杂志, 2019, 40(6): 111–116.

[20] Tamminen M, Karkman A, Lohmus A, et al. Tetracycline resistance genes persist at aquaculture farms in the absence of selection pressure [J]. Environmental Science & Technology, 2011, 45(2): 386–391.

[21] 陈奕彬, 胡娟, 杨宪宽, 等. 抗菌肽在水产养殖中的应用研究进展 [J]. 饲料工业, 2015, 36(12): 36–39.

[22] 鲁曦. 低剂量抗生素刺激条件下耐药基因水平传播的机制研究 [D]. 广州: 华南理工大学, 2012: 3–5.