

4 种常见鲤科鱼类 DNA 条形码的研究

王茜, 金毅成 (天津农学院水产科学系, 天津市水产生态及养殖重点实验室, 天津 300384)

摘要 测定了天津地区养殖的彭泽鲫、黄金鲫、乌克兰鳞鲤、鲤鱼 4 种共 13 尾鱼长度为 814 bp 的 COI 部分基因序列, 以白鲢、罗非鱼作为外群。利用 Mega4.1 软件进行序列组成统计分析、种内及种间遗传距离分析, 并用邻接法构建系统发育树(NJ 树), 在 NJ 树上共发现由不同物种组成的 5 个分支, 这与传统的分类学结果一致。该研究结果显示, COI 基因部分序列不但可以作为物种辨识的良好 DNA 条码, 而且在鲤科鱼类的种间系统发生关系分析方面也具有一定的适用性。

关键词 鲤科鱼类; DNA 条形码; 分子系统学; COI 基因

中图分类号 S188 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2014)27-09281-02

Study on DNA Barcoding of Four Common Cyprinidae Fish

WANG Qian, JIN Yi-cheng (Tianjin Key Lab of Aquatic Ecology and Aquaculture, Department of Fishery Science, Tianjin Agriculture School, Tianjin 300384)

Abstract The partial COI gene of Pengze crucian carp, gold crucian carp, ukraine scaly carp, carp, silver carp and tilapia fish in Tianjin were studied. 814 bp DNA fragments were obtained and the sequences were analyzed. Statistics of sequence compositions and genetic distance were obtained by using MEGA4.1 software. The phylogenetic tree was also performed by using neighbor-joining method. The result showed: the 15 species could be divided into five groups. This is consistent with the results of the taxonomy. And the study indicated that the partial sequence of COI gene was not only a good DNA barcode to identify different species, but also had certain applicability in the analysis of interspecific phylogenetic relationships of Cyprinidae.

Key words Cyprinidae; DNA barcoding; Molecular systems; COI gene

利用 DNA 条形码技术鉴别已知物种和发现新物种构建条形码标准数据库, 是目前分子生物学和分类学发展的最新方向^[1-3]。与其他分子标记如 RFLP、RAPD、基因芯片技术相比, DNA 条形码具有易于构建统一的 DNA 条形码数据库; 重复性高; 使用方便等优势。2003 年在美国 CSHA(The Cold Spring Harbor Asia Conferences) 召开的全球会议制定了国际生命条形码计划(International Barcode of Life project) 的编定计划, 并首次将 DNA 条形码技术用于海洋生物的普查研究^[4]。很多国际组织也自行建立 DNA 条形码数据库, 有较大影响和较大规模的组织包括 FISH-BOL、Canadian Fauna and Birds 等。FISH-BOL 组织计划对所有鱼类进行 DNA 条形码数据库的建立, 重点针对 1.5 万种海洋鱼类的 DNA 条形码, 目前已经获得 5 000 多种鱼类的 DNA 条形码数据。WARD 等^[5]对澳大利亚 207 种海洋鱼类进行 DNA 条形码的测序, 发现所研究的鱼类都能被 COI 有效区分, 并认为 COI 基因可以反映这些鱼类的系统发育关系。LAKRA 等^[6]对印度洋 37 科 79 属 115 种海洋鱼类进行 DNA 条形码研究, 并证明了种内遗传距离明显小于种间遗传距离, 从 NJ 树上显示 COI 基因可以清楚地反映鱼类的系统发育关系, 且与传统形态学的分类地位基本吻合, 得出该基因可以作为 DNA 条形码解决印度鱼类中存在分类模糊的问题。彭居俐等^[7]分析了鱼类 32 尾的 COI 基因序列, 结果表明, 基于 COI 基因的 DNA 条形码在识别鱼类物种方面与传统形态学基本吻合, 且该基因可以探讨鱼类种间的系统发育关系, 认为 COI 基因作为鱼类 DNA 条形码进行物种鉴定具有可行性。周佳怡^[8]验

证了线粒体 COI 基因在石斑鱼亚科物种鉴定中的有效性以及 DNA 条形码用于石斑鱼亚科的系统发育分析的可行性。笔者对 4 种常见鲤科鱼类 DNA 条形码进行了研究, 为进一步研究鱼类分子系统以及物种分化提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料 鲤鱼(L)、黄金鲫(H)、彭泽鲫(PJ)、乌克兰鳞鲤(W)、罗非鱼(LF)、白鲢(BL) 采自天津市换新水产良种场, 用 95% 的乙醇保存。

1.2 DNA 提取 DNA 提取采用常规的苯酚-氯仿法。

1.3 PCR 扩增 (1) PCR 扩增的目的片段为 COI 基因的部分序列, 扩增引物参照文献[7], L5956-co1 : cacaagacattggcaccct; H6855-co1 : agtcagctgaacttttac。

(2) PCR 反应体系: PCR 反应体系为 50 μ l, PCR 反应体系中各组分的量: DNA 1 μ l (约 100 ng), 缓冲液 5 μ l (10 \times), Mg^{2+} 5 μ l (25 mmol/L), 引物 1 和 2 各 2 μ l (10 μ mol/L), dNTP 1.25 μ l (10 mmol/L), Taq 酶 0.4 μ l (5 U/ μ l), 水 33.35 μ l。

(3) PCR 反应程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 45 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s, 35 循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。同时, 设置空白对照。

1.4 PCR 产物测序 选择条带明亮、清晰的扩增产物进行测序, 在北京华大基因有限公司 ABI-3730 自动测序仪上完成测序。

1.5 数据处理 将测序结果校正后在 NCBI 中进行相似性搜索, 确保所得序列的准确性。后将 15 条序列进行比对。使用 MEGA4.1 软件对对比结果进行分析。计算各样本之间的遗传距离 (及其标准差), 各数据组碱基的组成 (nucleotide composition)、变异位点 (variable sites)、保守位点 (conserved sites)、简约信息位点 (parsimony information sites)、自裔位点

基金项目 天津市应用基础及前沿技术研究计划 (天津自然科学基金, 11JCYBJC08200)。

作者简介 王茜 (1971 -), 女, 山东单县人, 副教授, 博士, 从事水产生物分子系统学的研究。

收稿日期 2014-08-11

(singleton sites)等。利用 Mega 4.1 并基于 p-distance 模式,采用 NJ 法重复 1 000 次分别构建分子系统树。

2 结果与分析

2.1 COI 条形码序列特征分析 对所测序列进行分析,T、C、A、G 碱基平均含量分别为 28.8%、27.3%、26.3%、17.6%,显示 G 碱基相对贫乏,其中 A + T 含量(55.1%)略高于 C + G 含量(44.9%),即鱼类 COI 基因表现出不明显的碱基组成偏向性。其中变异位点 218 个,保守位点 596 个,简约信息位点 130 个,自裔位点 88 个。分别占整个序列的 26.71%、73.04%、15.93% 和 10.78%。转换位点(66)明显多于颠换位点(24),转换颠换比 2.48,表明基因序列的突变未达到饱和,适用于系统发育分析。碱基序列转换成氨基酸序列后,将对准后的序列采用 MEGA4.1 软件对每个样本 mtDNA COII 编码区的氨基酸组成及密码子使用频率进行分析,结果显示,COI 基因 816 bp 共编码 238 个氨基酸,其中 36 个发生了变异,变异率为 15%。由 21 种氨基酸组成,其中丝氨酸(Ser)、异亮氨酸(Lie)含量最高,平均含量分别为 11.47% 和 14.21%。谷氨酸(Glu)含量最低只有 1.02%,反映出 COI 基因在氨基酸组成上有一定的偏向性;同时通过各个序列氨基酸含量分析可知,21 种氨基酸在序列中的含量差异不大。

2.2 COI 条形码遗传距离分析 6 个物种 15 条 COI 基因序列基于 p-distance 模型构建的邻接树见图 1。由图 1 可知,15 个物种的种内平均遗传距离在 0~8.42%,L1、L2 与 L3 种内平均遗传距离较大为 1.38%,H1 与 H2、H3 的种内平均遗传距离为 1.22%,PJ1 与 PJ2、PJ3 种内平均遗传距离最小为 0.02%。所有鱼类的种间平均遗传距离为 18.23%,显著大于种内平均遗传距离(0.86%)。

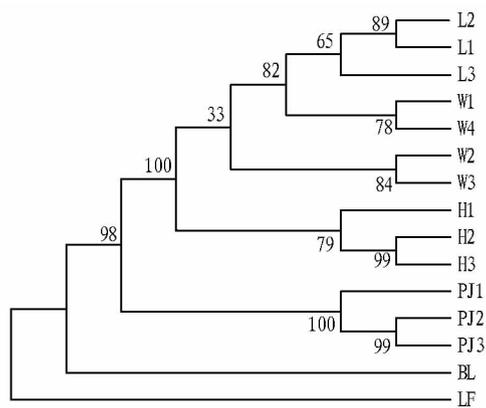


图 1 鱼类 COI 基因基于 P-distance 模型构建的邻接树(NJ 树)

3 讨论

(1) 该研究表明,序列中没有碱基的插入、缺失,T、C、A、G 碱基平均含量分别为 28.8%、27.3%、26.3%、17.6%,其中 A + T 含量(55.1%)略高于 C + G 含量(44.9%),此结果与周佳怡^[8]研究我国沿海石斑鱼的 DNA 条形码的结果相似(其结果为 T、C、A、G 碱基平均含量分别为 30.2%、27.6%、24.3%、17.9%,其中 A + T 含量 54.5% 高于 C + G 含量 45.5%),即鱼类 COI 基因表现出不明显的碱基组成偏向性。

DESALLE 等^[9]指出,在 DNA 进化过程中,转换发生的频率比颠换高的多,这是由于分歧较近的物种间编码区 DNA 序列较多发生同义突变的结果,但对于分歧关系较远的物种,序列的转换已趋于饱和,碱基替换的形式由以转换为主转向以颠换为主,转换与颠换的比值随分歧时间而逐渐变小。HOLMQUIST^[10]认为该临界值约为 0.4,该试验碱基转换位点 66 个明显多于颠换位点 24 个,转换颠换比(R)2.48,表明基因序列的突变未达到饱和,适用于系统发育分析。各个序列氨基酸含量分析显示,21 种氨基酸在 33 条序列中的含量差异不大。同时同义密码子的使用存在一定的偏倚,且这种现象较普遍,梁菲菲^[11]在密码子偏性的影响因素及研究意义中有清晰的阐释。

(2) 物种的种内差异和种间差异之间存在一个容易辨别的界限,可作为辨别是否属于同一物种的标准。HEBERT 等^[12]认为 COI 基因序列有效地进行物种鉴定的关键点在于种间的遗传距离必须大于种内的遗传距离,即物种的种内 COI 序列的遗传距离一般小于 1%,且距离差异约达 10 倍。该研究通过对鱼类 15 个个体基于 p-distance 模型计算的种内平均遗传距离在 0~8.42%,小于 1% 的占 82.43%,小于 2% 的占 94.86%。HEBERT 等^[13]对 11 个动物门共计 13 320 个物种进行遗传距离的统计分析,发现大部分种内的遗传距离小于 2%,一般都小于 1%,这与该试验结果相似。GOVINDARAJU^[14]等采用随机扩增多态性(RAPD)技术对印度洋沿岸 7 种石斑鱼的研究发现种内遗传距离很近(1.08%),与该试验结果一致;种间平均遗传距离为 18.23%,与周佳怡^[8]研究的石斑鱼的结果(石斑鱼亚科 10 属 60 个物种共计 381 尾样本的种间的遗传差异在 4.95%~13.47%)相似;HEBERT 等^[15]对北美 260 种鸟类进行 COI 基因序列测定结果显示,鸟类 COI 基因序列在属内种间的平均遗传距离为 7.93%,而种内遗传距离为 0.43%。这表明该试验结果的合理性。

(3) 在 NJ 树上共发现 5 个分支显示不同物种组成,BL 和 LF 作为外群在树的基部最早被分开,L1、L2 与 L3 聚为一支(支持率为 89%、65%)。H1、H2、H3 聚为一支(支持率为 99%)。PJ1、PJ2、PJ3 聚集,且达到 100%。从 NJ 树可以很好地将不同种的鱼类区分开来。W1 与 W4 关系较近,构成一个支系(支持率为 78%);W2 与 W3 聚为一支(支持率为 84%)。但这 2 个分支并没有聚成姐妹群,且遗传距离较大,造成这部分分支混乱的原因有待进一步探讨。该研究从构建的 NJ 树上的部分系统发育信息可以得出,COI 基因是一个有效的 DNA 条形码标准基因,但由于试验测定的鱼类种类及尾数偏少,因此需要采用更多分子数据,综合其形态学、骨骼学等资料进一步研究,获得更为真实的鱼类各属间的系统发育关系。

参考文献

- [1] 马兰,黄原.生物分类学发展的新方向——DNA 分类学[J].黄冈师范学院学报,2005,25(3):41-43.
- [2] 焦明超,赵大显,欧阳珊.DNA 条形码技术在生物分类学中的应用前景[J].湖北农业科学,2011,50(5):886-889.

率呈下降趋势。这表明随着基本苗的增加,群体逐渐变大,田间通风透气条件变差,加剧了个体与群体、主穗与分蘖穗、穗数与粒数的矛盾,导致个体素质减弱,成穗率下降,功能叶面积减少,因此要得到群体大小适中,个体健壮,功能叶片多的高产群体,就必须确定适宜的基本苗和播种量。

表3 不同基本苗对群体指标的影响

基本苗	单株成穗数//个	高峰苗数万株/hm ²	成穗率%	叶面积指数	上3叶比例//%
5.5	3.7	427.5	70.5	7.4	48.2
6.3	3.4	477.0	67.6	7.5	48.1
7.5	3.1	517.5	67.2	7.9	47.7
9.1	2.6	579.0	61.9	8.3	45.3
10.5	2.4	633.0	58.5	8.3	43.5

2.2.2 对产量及其构成因素的影响。从表4可以看出,增加基本苗,单位面积穗数呈上升趋势,与高峰苗、叶面积指数的变化趋势一致,相反,穗粒数、结实率、千粒重与单株成穗数、功能叶面积率的变化趋势一致,都呈下降趋势。而最终产量的变化趋势与其他指标有所不同,随着基本苗数增加,先呈上升的趋势,到达最高点后下降,呈单峰曲线变化,即只有在基本苗适宜时,产量构成因素才能达到协调与平衡,实现高产稳产。根据产量与基本苗间的二次函数 $y = -7.7139x^2 + 116.33x + 197.21$ 可以得出,当基本苗在112.5万株/hm²左右、单株成穗数3.0~3.5个时产量最高。

表4 不同基本苗对水稻产量及其构成因素的影响

基本苗	穗数	穗粒数	结实率	千粒重	产量
万株/hm ²	万穗/hm ²	粒	%	g	kg/hm ²
82.5	20.1	120.5	91.2	27.2	9 012.0
94.5	21.5	115.8	91.2	27.2	9 264.0
112.5	23.2	116.5	90.7	27.0	9 928.5
136.5	23.9	103.4	89.1	26.8	8 851.5
157.5	24.7	99.8	88.5	26.5	8 671.5

(上接第9282页)

- [3] 肖金花,肖晖,黄大卫.生物分类学的新动向——DNA条形码[J].动物学报,2004,50(5):852-855.
- [4] MALLETT J, WILLINOTT K. Taxonomy: renaissance or Tower of Babel[J]. Trends in Ecology And Evolution, 2003, 18(2): 57-59.
- [5] WARD R D, HANNER R, HEBERT P D N. The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-BOL [J]. Journal of Fish Biology, 2009, 74(2): 329-356.
- [6] LAKRA W S, VERMA M S, GOSWAMI M, et al. DNA barcoding Indian marine fishes[J]. Molecular Ecology Resources, 2011, 11: 6-71.
- [7] 彭居刚,王绪祯,王丁,等.基于线粒体COL基因序列的DNA条形码在鲤科鲃属鱼类物种鉴定中的应用[J].水生生物学报,2009,33(2):271-276.
- [8] 周佳怡.中国沿海石斑鱼亚科的DNA条形码研究[D].广州:暨南大学,2011.
- [9] DESALLE R T, FREEDMAN T, PRAGER E M, et al. Tempo and mode of sequence evolution in mitochondrial DNA of Hawaiian Drosophila [J]. J Molecular Biology and Evolution, 1987, 26: 157-164.

3 结论与讨论

3.1 播种期对直播稻产量的影响 前人对播期对水稻生长发育及产量构成因素的影响研究较多,结果也较一致。直播稻推迟播种,水稻营养生长期缩短,抽穗、灌浆和成熟期延迟,个体素质变弱,群体质量下降,株高、节间数下降。随着播期推迟,穗型变小,穗粒数减少^[5-6]。而灌浆期后延,加上前期营养物质积累少,又造成结实率下降,最终影响产量;且生育后期受低温影响的风险加大,最终造成产量降低,品质变劣。

所以,麦收后及早播种有利于延长生育期,增加水稻生长量,改善水稻产量构成因素,提高穗粒数、结实率和千粒重,最终实现较高的产量。

3.2 基本苗对水稻产量的影响 直播稻的特点是基本苗多、群体大、个体偏弱,所以难以形成高产群体^[7]。众多研究表明,随着基本苗的增加,群体逐渐变大,个体生长条件变差,导致个体素质减弱,成穗率下降,功能叶面积减少。因此要得到群体大小适中、个体健壮、功能叶片多的高产群体,就必须确定适宜的基本苗和播种量。该研究表明,邗江地区直播稻基本苗在112.5万株/hm²左右、单株成穗3.0~3.5个时,产量构成因素间达到了协调与平衡,实现了高产稳产。

参考文献

- [1] 卢百关,秦德荣,樊继伟,等.江苏省直播稻生产现状、趋势及存在问题探讨[J].中国稻米,2009(2):45-47.
- [2] 郁进元,何岩,赵志福,等.长宪法测定作物叶面积的校正系数研究[J].江苏农业科学,2007(2):37-39.
- [3] 凌启鸿,张洪程,丁艳峰,等.水稻高产技术的新发展—精确定量栽培[J].中国稻米,2005(1):3-7.
- [4] 凌启鸿,张洪程,戴其根,等.水稻精确定量栽培技术[J].中国农业科学,2005(12):1-10.
- [5] 谢正荣,郭映全,沈小妹,等.太湖农区水稻不同类型品种及播期对生育期与实产的影响初探[J].上海农业学报,2000,16(1):28-32.
- [6] 王夫玉,张洪程.播期对淮北粳稻产量构成因素的影响[J].上海交通大学学报:农业科学版,2001,19(3):211-215.
- [7] 卢燕,王小军,张洪程,等.不同品种不同密度水直播稻的高产机理研究[J].江苏农业科学,2008(1):18-21.
- [10] HOLMQUIST R. Transitions and transversions in evolution to understanding[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 1983, 19: 134-144.
- [11] 梁菲菲. 密码子偏性的影响因素及研究意义[J]. 畜牧与饲料科学, 2010, 31(1): 118-119.
- [12] HEBERT P D N, CYWINSKA A, BALL S L, et al. Biological identifications through DNA barcodes[J]. Proceeding the Royal of Society B, 2003, 270: 313-322.
- [13] HEBERT P, RATNASINGHAM S, JEREMY R. Barcoding animal life: cytochrome oxidase subunit I divergences among closely related species [J]. Proceedings of the Royal Society Biological Sciences, 2003, 270: 96-99.
- [14] GOVINDARAJU G S, JAYASANKAR P. Taxonomic Relationship Among Seven Species of Groupers (Genus *Epinephelus*; Family Serranidae) as Revealed by RAPD Fingerprinting [J]. Marine Biotechnology, 2004, 6: 229-237.
- [15] HEBERT P D N, STOECKLE M Y, ZEMBLAK T S, et al. Identification of birds through DNA Barcodes [J]. PLOS Biology, 2004, 2(10): 1657-1663.