

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2013.00931

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

单云晶^{1,2}, 鲁翠云¹, 李超¹, 张明昭¹, 顾颖¹, 孙效文¹

1. 中国水产科学研究院 黑龙江水产研究所, 黑龙江 哈尔滨 150070;

2. 大连海洋大学 水产与生命学院, 辽宁 大连 116023

摘要: 本研究通过对 5 个鲤养殖品种即高寒鲤(*Cyprinus carpio* Frigid carp)、松浦鲤(*Cyprinus carpio* Songpu carp)、蓝鳞鲤(*Cyprinus carpio* blue var)、松浦镜鲤(*Cyprinus carpio* Songpu mirror carp)和红镜鲤(*Cyprinus carpio* Red mirror carp)的线粒体 COI 基因部分序列的测定, 比较并分析了其遗传多样性和系统进化关系。在 5 个鲤品种共 100 个样本的线粒体 COI 序列中检测到 8 种单倍型, 其中 5 个单倍型(H1、H2、H4、H5、H6)涵盖样本较多, 占总样本数的 94.06%。蓝鳞鲤的单倍型数最少, 仅有 1 个, 红镜鲤单倍型数为 2 个, 其余 3 个品种的单倍型数均为 5 个。5 个品种单倍型多样性(H_d)在 $0.160 \pm 0.070 \sim 0.811 \pm 0.055$, 其中, 遗传多样性最高的为高寒鲤。AMOVA 结果表明, 品种间变异(50.28%)略高于品种内变异(49.72%), 各品种间的 F_{ST} 值在 $0.711 \sim 0.831$, 其中蓝鳞鲤与其他群体之间差异最大。用 MEGA4.0 软件构建的基于遗传距离的进化树表明, 5 个养殖品种中, 高寒鲤和红镜鲤的遗传距离最近($D=0.31$), 聚为一支; 松浦镜鲤和松浦鲤的遗传距离较近($D=0.33$), 聚为一支; 蓝鳞鲤与其他品种存在较大遗传差异, 单独形成一个分支。除蓝鳞鲤外, 其余 4 个养殖品种间均存在共享的单倍型(H2、H4、H5、H6), 可能是由于其在选育过程中亲本的遗传背景存在交叉, 同时也证明 DNA 条码在分析种内品种间遗传关系时具有可行性但具有一定的局限性。

关键词: 鲤养殖品种; 遗传多样性; DNA 条形码; COI 基因

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2013)05-0931-08

鲤(*Cyprinus carpio*)是目前世界上养殖范围最广、历史最悠久的淡水鱼类, 广泛分布于欧亚大陆, 在长期的养殖和驯化过程中, 形成了多个品种或品系^[1], 仅中国就育成鲤的养殖品种 10 余种。目前, 对于鲤科鱼类种属间系统关系的研究较多, 而对鲤亚种和养殖品种的研究较少, 仅利用鲤的形态学和骨骼等特征对其进行的系统学研究, 能提供的信息量相对较少, 而且容易受到环境等因素的影响, 难以全面地提供系统发育关系的信息。随着分子生物学技术的发展及分析手段的不断进步, Hebert 等^[2]提出了基于分子手段进

行物种鉴定的设想, 即利用线粒体细胞色素 C 氧化酶 I(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, 并根据每个物种在该基因上的鉴别位点, 简单、快捷而有效地进行物种的识别和鉴定工作。随着研究工作的陆续开展, 许多研究者在越来越多的动物类群中确认了 DNA 条码技术的有效性, 从而减少了记录物种过程中对形态学的依赖, 同时也改变了物种鉴定工作的流程^[3-4]。与形态学鉴定和理化鉴定相比, DNA 条码鉴定是一个以碱基顺序和种类反映物种的客观指标, 可以实现门、纲、目、科、属、

收稿日期: 2012-10-12; 修订日期: 2013-03-08.

基金项目: 农业部公益性行业科研专项(200903045); 国家 863 计划项目(2011AA100402-5); 国家科技基础条件平台建设运行项目.

作者简介: 单云晶(1988-), 女, 硕士, 研究方向为水产动物遗传育种. E-mail: shanyunjing1988@sina.com

通信作者: 孙效文, 研究员, 博士生导师, 研究方向为水产生物技术及基因组学. E-mail: sunxw2002@163.com

种、亚种的准确鉴定,不受鉴定者的主观因素和被鉴定物种生长地域的影响^[5]。DNA 条码鉴定技术首先应用于动物领域,一个基因就可以解决大多数动物的物种鉴定问题且具有高度的可重复性,据此,已有研究表明,线粒体细胞色素 C 氧化酶 I(COI)基因是许多鱼类、昆虫和鸟类等动物分类与鉴别的理想 DNA 条形码^[6]。在水产动植物的种属鉴定研究中已有相关报道^[7-11]。

本研究选用了黑龙江水产研究所培育的 5 个杂交鲤品种即高寒鲤(*Cyprinus carpio* Frigid carp, GH)、松浦鲤(*Cyprinus carpio* Songpu carp, SL)、蓝鳞鲤(*Cyprinus carpio* blue var, LL)、松浦镜鲤(*Cyprinus carpio* Songpu mirror carp, SJ)和红镜鲤(*Cyprinus carpio* Red mirror carp, HJ)为研究对象,采用测序的方法获得线粒体 COI 基因片段即标准 DNA 条码序列,并通过对测序结果的分析,计算 Kimura 双参数模型遗传距离,构建系统发生树,探讨各品种间的起源和进化关系以及 DNA 条码技术在对于同一种属不同品种间的种质鉴定是否有效,以期对鲤的品种鉴定和管理提供一定的理论依据,对鲤种质资源的开发和利用具有十分重要的理论价值和现实意义。

1 材料与方法

1.1 研究样品来源及总 DNA 提取

本研究分析的 5 个鲤品种为中国水产科学研

究院黑龙江水产研究所培育,样本均采自黑龙江水产研究所松浦试验场。具体鲤品种名称、数量及选育背景信息^[12-16]见表 1。

用传统的蛋白酶 K 消化,酚-氯仿抽提法从鲤鳍条组织中分离、纯化总 DNA^[17]。

1.2 COI 基因部分序列扩增及测序

依据 Ward 等^[18]设计的鲤线粒体 COI 基因的通用引物进行 PCR 扩增,正向引物 FishF1(TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC)、FishF2(TCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC)和反向引物 FishR1(TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAAATCA)、FishR2(ACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA)由上海生工生物工程技术有限公司合成。每种鱼随机选用 4 个个体,设置 4 个退火温度梯度(56℃、58℃、60℃、62℃),用 2 对引物交叉进行筛选,最终确定 FishF1 和 FishR1 组合于 60℃在所有样本中均获得了稳定、清晰的条带,可用于全部样品的扩增。PCR 反应体系为 25 μL,包括 10×PCR 缓冲液 2.5 μL、Mg²⁺(15 mmol/L)2.5 μL、上下游引物(10 μmol/L)各 0.5 μL、dNTPs(2 mol/L)各 2.5 μL、DNA 模板 100 ng、Taq DNA 聚合酶 1 U,补足无菌水到 25 μL。PCR 反应条件为 94℃预变性 3 min; 94℃变性 30 s, 60℃退火 30 s, 72℃延伸 1 min, 扩增 30 个循环;最后 72℃延伸 5 min。扩增产物经 8%聚丙烯酰胺凝胶电泳检测后,送生物工程(上海)有限公司进行测序。

表 1 鲤品种的名称、数量及选育背景
Tab.1 Carp sample names, quantity and genetic background

名称 name	代码 code	存在状态 status	数量/尾 quantity	选育亲本来源 source of breeding parents
高寒鲤 <i>Cyprinus carpio</i> Frigid carp	GH	养殖 aquaculture	20	黑龙江野鲤, 荷包红鲤, 德国镜鲤, 散鳞镜鲤 <i>Cyprinus carpio haematopterus</i> , <i>C. c.</i> var. <i>wuyuanensis</i> , <i>Cyprinus carpio</i> L., <i>C. c.</i> var. <i>scattered mirror</i>
松浦鲤 <i>Cyprinus carpio</i> Songpu carp	SL	养殖 aquaculture	21	黑龙江野鲤, 荷包红鲤, 德国镜鲤, 散鳞镜鲤 <i>Cyprinus carpio haematopterus</i> , <i>C. c.</i> var. <i>wuyuanensis</i> , <i>Cyprinus carpio</i> L., <i>C. c.</i> var. <i>scattered mirror</i>
蓝鳞鲤 <i>Cyprinus carpio</i> blue var	LL	养殖 aquaculture	24	黑龙江野鲤, 红镜鲤 <i>Cyprinus carpio haematopterus</i> , <i>C. c.</i> Red mirror carp
松浦镜鲤 <i>Cyprinus carpio</i> Songpu mirror carp	SJ	养殖 aquaculture	21	德国镜鲤, 散鳞镜鲤 <i>Cyprinus carpio</i> L., <i>C. c.</i> var. <i>scattered mirror</i>
红镜鲤 <i>Cyprinus carpio</i> Red mirror carp	HJ	养殖 aquaculture	14	兴国红鲤, 苏联镜鲤 <i>C. c.</i> var. <i>singuanensis</i> , <i>C. c.</i> var. <i>Russian mirror</i>

1.3 外群的选择及序列分析

鲫(*Carassius auratus auratus*)在分类学上与鲤关系密切, 因此本研究选择鲫作为外群分析鲤野生群体亲缘关系^[19]。

测序结果编辑后用 NCBI 网站提供的 Barcode Submission Tool 递交到 GenBank 数据库中。部分公共数据库中的序列, 可能由于递交者扩增和编辑序列的方法不同及引物的差异, 在两端往往存在一些差异, 这部分差异在使用 DNAsp v.5^[20]分析统计单倍型时, 不计入分析结果。使用 DNAsp v5 计算变异位点和简约信息位点。使用 MEGA4^[21]计算所得单倍型的碱基组成、单倍型间的转换、颠换比值。根据基于 Kimura 双参数模型^[22]计算品种内部的遗传距离及各个类群之间的平均遗传距离。利用软件 Arlequin3.0^[23]中的分子方差分析(AMOVA)计算群体间的遗传分化。最后用 MEGA4 软件中的邻接法(Neighbor-Joining^[24])构建 Kimura 双参数模型的单倍型进化树和品种间进化树, 可靠性经过 1 000 次自举(Bootstrap)检验^[25]。

2 结果与分析

2.1 序列特征

将所测得序列通过 BLAST 搜寻 GenBank 中的鲤(加拿大提交)COI 基因相关序列并进行 MEGA 比对。所测得鲤序列与下载序列同源性为 92.26%, 初步确认测得序列为鲤的线粒体 COI 基因目标序列。用于进行群体分析的 COI 基因序列长为 639 bp, 编码 212 个氨基酸。其中保守位点为 613 个, 变异位点为 20 个, 简约信息位点为 13 个, 主要的变异位点集中在松浦鲤和松浦镜鲤中。其中, 1 个松浦鲤个体序列内部有八碱基的插入, 这些插入并不是一个三联体, 理论上会导致 5~49 碱基间的移码突变, 因此查找单倍型时将这些插入变异排除在外。所测得的所有序列中 T、C、A、G 的平均碱基含量分别为 27.9%、28.6%、26.5%、17%, A+T 的含量为 56.5%, 明显高于 G+C 的含量 43.5%。9 个单倍型平均两个位点发生转换, 转换/颠换平均值为 3.4。

2.2 鲤单倍型及单倍型多样性

在 5 种鲤 100 个样本中共检测到 8 种单倍型(表 2), 其中 5 个单倍型涵盖样本较多, 即 H1、H2、H4、H5、H6。每个单倍型所占样本比例见图 1, H8 为松浦鲤所特有, H7 为高寒鲤所特有, H3 为松浦镜鲤所特有, H1 为蓝鳞鲤所特有。高寒鲤、松浦鲤、松浦镜鲤共享单倍型 H2 和 H4, 并且在 H2 中, 松浦鲤和松浦镜鲤所占比例较高, 均达到 40%; 红镜鲤、高寒鲤、松浦镜鲤共享单倍型 H5; 除蓝鳞鲤外, 其他 4 种共享单倍型 H6, 其中 56.25%为红镜鲤。每个鲤品种的单倍型数(n_h)为 1~5 个, 高寒鲤、松浦鲤、松浦镜鲤单倍型数为 5 个, 红镜鲤为 2 个, 蓝鳞鲤为 1 个。

5 个鲤品种的单倍型和核苷酸多态性分析结果显示, 单倍型多样性(H_d)在 $0.160 \pm 0.070 \sim 0.811 \pm 0.055$, 核苷酸多样性(π)在 $0.0003 \pm 0.0005 \sim 0.0032 \pm 0.00145$ 。其中, 遗传多样性最高的是 GH($H_d = 0.811 \pm 0.055$, $\pi = 0.0032 \pm 0.0015$), 最低的是 LL($H_d = 0.160 \pm 0.070$, $\pi = 0.0003 \pm 0.0005$)。所有群体的 Tajima's D 中性检验范围为 $-1.149 \sim 1.752$, 除 LL 外, 其他群体的中性检验结果显示均不显著($P > 0.1$), 符合中性突变(表 3)。

2.3 鲤品种间的遗传分化及遗传距离

利用线粒体 COI 序列比较 5 个鲤养殖品种的

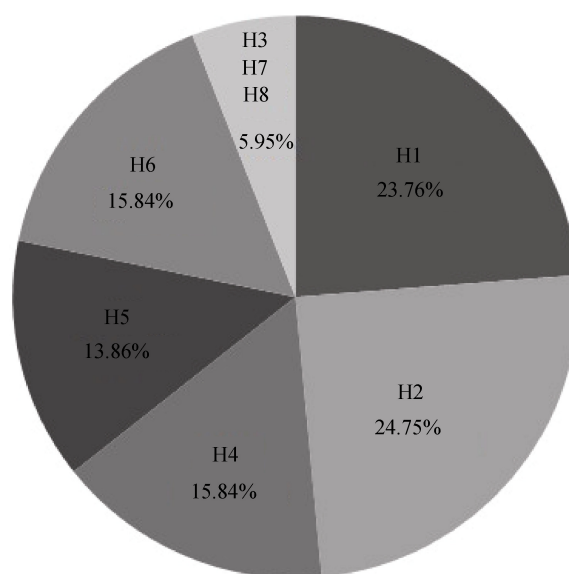


图 1 8 个单倍型覆盖 100 个样本的比例

Fig.1 The proportion of 8 haploid types covering 100 samples

表 2 COI 基因单倍型在 5 个鲤品种的分布

Tab.2 Haplotypes from 5 *Cyprinus carpio* varieties base on COI gene of mtDNA

单倍型 haplotype	总数 total	品种 variety					GenBank 登录号 GenBank access. no.
		高寒鲤 <i>Cyprinus carpio</i> Frigid carp	松浦鲤 <i>Cyprinus carpio</i> Songpu carp	蓝鳞鲤 <i>Cyprinus carpio</i> blue var	松浦镜鲤 <i>Cyprinus carpio</i> Songpu mirror carp	红镜鲤 <i>Cyprinus carpio</i> Red mirror carp	
H1	24			24			KC108645
H2	25	3	11		11		KC108646
H3	2				2		KC108647
H4	16	7	6		3		KC108648
H5	14	6			3	5	KC108649
H6	16	2	3		2	9	KC108650
H7	2	2					KC108651
H8	1		1				KC108653

表 3 5 个鲤品种基于线粒体 COI 基因的单倍型多样性

Tab.3 Genetic diversity estimates base on COI gene in 5 *Cyprinus carpio* varieties

$n=100; \bar{x} \pm SD$

品种 variety	n_h	H_d	π	中性检验 neutrality text	
				Tajima's D	P
高寒鲤 <i>Cyprinus carpio</i> Frigid carp	5	0.811±0.055	0.003±0.0015	-1.4054	>0.10
松浦鲤 <i>Cyprinus carpio</i> Songpu carp	4	0.636±0.080	0.0027±0.0016	-0.7185	>0.10
蓝鳞鲤 <i>Cyprinus carpio</i> blue var	1	0.160±0.070	0.0003±0.0005	-1.1498	>0.10
松浦镜鲤 <i>Cyprinus carpio</i> Songpu mirror carp	5	0.757±0.086	0.0032±0.0015	0.1858	>0.10
红镜鲤 <i>Cyprinus carpio</i> Red mirror carp	2	0.495±0.088	0.0015±0.0010	1.7529	0.10>P>0.05

注: n_h 表示单倍型数; H_d 表示单倍型多样性; π 表示核苷酸多样性。
Note: n_h , number of haplotypes; H_d , haplotype diversity; π , nucleotide diversity.

遗传分化, 根据软件 Arlequin3.0 的 AMOVA 结果表明, 来自于品种间的遗传差异(50.28%)略高于来自品种内的差异(49.72%, 表 4)。群体间遗传差异的 F_{ST} 分析结果显示 5 个养殖品种之间都存在遗传分化(F_{ST} 值均为正); LL 与其他群体存在显著的遗传差异($P<0.05$), F_{ST} 在 0.711 5~0.831 2; 其他品种之间虽然有差异但不显著, 其中 SL 和 SJ 间遗传差异最小为 0.01。采用 MEGA4.0 软件, 根据 Kimura 双参数模型计算各品种之间的遗传距离

(D)(表 5)。结果表明, SL 和 SJ 之间的遗传距离最近, 为 0.003 0; SL 和 LL 之间的遗传距离最远, 为 0.005 8; LL 与其他品种之间的遗传距离均较远。此外, 品种内遗传距离中 LL 表现为没有差异, 只形成一个单倍型, SJ 的种内遗传距离最大, 为 0.003 0。

2.4 基于 COI 基因的鲤系统进化树

分别根据遗传距离和单倍型构建品种之间的 NJ 系统进化树。从图 2 得到, 进化树主要分为

表 4 5 个鲤品种线粒体 COI 变异区序列的 AMOVA 结果

Tab.4 The result of AMOVA based on COI gene of mtDNA in 5 *Cyprinus carpio* varieties

变异来源 source of variation	自由度 df	平方和 sum of squares	方差分量 variance component	总变异百分比 % percentage of variation
群体间 among populations	4	57.842	0.6870 V_a	50.28***
群体内 within populations	95	65.228	0.6795 V_b	49.72***
总数 total	99	123.069	1.3665	

Note: * $P<0.05$, ** $P<0.005$, *** $P<0.001$.

表 5 基于 Kimura 双参数模型的 5 个鲤品种间平均遗传距离、 F_{ST} 值及各个类群内平均遗传距离
Tab.5 Mean genetic distance between and within 5 *Cyprinus carpio* varieties

品种 variety	品种间平均遗传距离及 F_{ST} 值 mean distance between varieties and F_{ST}					类群内平均遗传距离 mean distance within varieties
	GH	SL	LL	SJ	HJ	
GH		0.2167	0.7115	0.1108	0.1323	0.0029
SL	0.0036		0.7496	0.0100	0.3941	0.0028
LL	0.0047	0.0057		0.7494	0.8312	0.0001
SJ	0.0033	0.0029	0.0057		0.3198	0.0030
HJ	0.0031	0.0043	0.0055	0.0040		0.0024

注: 对角线以上为群体间的遗传距离, 对角线以下为群体间的 F_{ST} 。
Note: Figures above the diagonal are genetic distance, and those below the diagonal are F_{ST} .

3 个分支: SL 与 SJ 遗传距离较近, 聚为一支; GH 与 HJ 遗传距离较近, 聚为一支; LL 与其他 4 个群体遗传距离较大, 单独聚为一支。从图 3 单倍型进化树中得到, 进化树主要分为 2 个分支, 大多数 GH、SL、SJ 遗传关系较近且单倍型数目较多, 均为 4~5 个; 全部 LL 和部分 GH、SJ、SL 存在独立单倍型; H2、H4、H5、H6 为主要的共享单倍型。可见, 基于单倍型的聚类结果与基于遗传距离的聚类结果相似。因为鲫在分类学上和鲤关系密切, 因此本研究选择鲫作为外群。

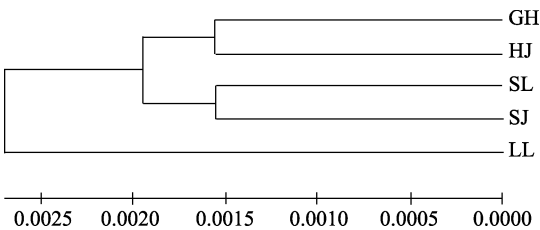


图 2 基于 COI 基因的遗传距离建立的 5 个鲤品种之间的 NJ 系统进化树

Fig.2 NJ tree based on the genetic distance of COI gene in five *Cyprinus carpio* varieties

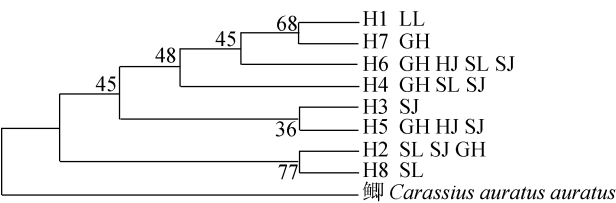


图 3 基于 Kimura 双参数模型构建的 COI 基因单倍型 NJ 树

Fig. 3 Neighbor-joining tree of COI gene haplotypes based on Kimura 2-parameter

3 讨论

3.1 基因序列及特征分析

伍献文等^[26]把中国所产鲤(*Cyprinus carpio*)划分为 4 个亚种: 西鲤(*C. carpio carpio*, 新疆)、鲤(*C. carpio haematopterus*, 黑龙江至闽江)、华南鲤(*C. c. rubrofasciatus*, 珠江、元江和海南岛)和祀麓鲤(*C. carpio chilia*, 云南各湖泊)。本研究样品均属于鲤(*C. carpio haematopterus*)这个亚种。

本研究初步分析并比较了 5 个鲤养殖品种线粒体 COI 基因部分序列的差异。由于 COI 基因是蛋白质编码基因之一, 对于蛋白质编码区域而言, 因蛋白质功能上的需要和三联体密码子结构的限制, 缺失/插入很少发生或发生后很容易被选择淘汰, 本次研究的序列除极少数个体(1 个 SL 个体)外没有发现碱基的插入与缺失。在碱基组成上, 研究发现 G 含量最低(17%), AT 含量(56.5%)明显高于 GC 含量(43.5%), 该结果与童金苟等^[27]的研究结果相似, 也与 COI 基因碱基组成中普遍存在的 AT 含量高现象一致。从原核生物到真核生物, 其基因组中碱基使用偏向性的现象广泛存在, 且不同物种间碱基的不均衡程度也各不相同。这一现象的产生可能与基因的表达水平、翻译起始效应、碱基组分、基因长度以及密码子反密码子间结合能力的大小有关^[28]。

在 DNA 进化过程中, 碱基转换(si)发生的频率要比颠换(sr)高得多, 本研究结果与此相符。利用转换/颠换比值 R , 可以估计序列的饱和度, 一般分歧时间越长、亲缘关系越远的分类单元之间

核苷酸发生颠换的频率越高, 即 si/sr 值越小, 由此可初步判断所研究的分类单元之间的进化关系^[29]。通过分析密码子 3 个位点的 R 值可知, 第 3 位点进化速度最快(4.4)、第 1 位点次之(1.1)、第 2 位点最为保守(0.5), 与遗传密码的特性保持一致。

3.2 养殖品种间的遗传分化

单倍型结果证明, DNA 条形码能够区分少数品种(全部 LL、大部分 HJ), 而多数品种不具有独特的单倍型(GH、SL、SJ 共享单倍型 H2 和 H4; HJ、GH、SJ 共享单倍型 H5; 除 LL 外, 其他 4 种共享单倍型 H6)。遗传距离结果与单倍型结果类似, 也同样显示 SL、SJ、GH 的遗传距离较近(0.003 0~0.003 3), HJ 只与部分 GH 距离较近(0.003 1), LL 与其他 4 个品种间的遗传距离均较远(0.004 7~0.005 8)。产生这种结果的原因可能是这些品种在选育过程中是以经济性状为目标, 几乎都是通过各种鲤之间的杂交选育而来。追溯其遗传背景可以了解 LL 是通过黑龙江野鲤♀和红镜鲤♂杂交产生; SJ 是通过德国镜鲤♀和散鳞镜鲤♂杂交产生; HJ 是通过兴国红鲤♀和苏联镜鲤♂杂交产生; SL 和 GH 的遗传背景最为复杂, 是通过黑龙江野鲤、荷包红鲤、散鳞镜鲤、德国镜鲤通过杂交、回交、雌核发育等技术经过定向选择所产生。GH 和 SL 虽然在选育方向上存在差异, 但其遗传背景相同因而存在共享单倍型, 并且遗传距离也较近; SL 和 SJ 之间因有相同亲本(德国镜鲤)也存在相当一部分共享单倍型, 这也很好地解释了为何 GH、SL 和 SJ 均存在共享单倍型; 部分 HJ 与 GH、SL、SJ 之间也存在共享单倍型, 原因可能是其亲本之间存在遗传关系或者是样品混淆了。LL 虽然与 GH 与 SL 存在共同亲本(黑龙江野鲤), 但与其他 4 个品种间在鳞片颜色上差异较大, 形成独立的单倍型。

3.3 DNA 条形码鉴别养殖品种的可行性

DNA 条形码作为一种新兴的技术, 在物种分类识别上有着快捷简单的优点, 它可以充分利用已有的遗传学数据, 使鉴定结果更加准确和可靠; 以 DNA 系统树为基础的分析方法使得实验结果一目了然, 与其他 DNA 鉴定方法一样, 系统发育分析同样得到序列分化值和 Bootstrap 支持值等

定量的数据^[30]。作为条形编码的基因, 必须同时具备 2 个特征, 一是具有相对的保守性, 便于通用引物扩增; 二是具有丰富的遗传变异, 能够将物种区别开来^[31]。Hebert 等^[32]认为, 在动物界中, COI 基因是合适的用于物种鉴定的 DNA 条形码标准基因, 因为动物线粒体 DNA 具有结构简单、呈母系遗传、几乎不发生重组、进化速度快等特点, 是研究种间分子进化和系统发育最有用的基因之一。目前, COI 基因用于种间 DNA 条形码的有效性已经得到广泛证明, 并且随着 BOLD SYSTEMS 数据库的产生, 来自世界各国物种的 DNA 条形码序列正在以每年 300 万条的速度增加, 该数据库使得种质鉴定的学术交流更加方便, 并且提供一个更广阔的集成平台。正如前文所述, DNA 条形码用于种间鉴定非常有效, 但是用于种内不同品种间的鉴定, 报道相对较少, 本研究目的在于探究 DNA 条码应用于种内不同品种间的鉴定是否有效, 结果表明, DNA 条码对于种内不同品种间的种质鉴定可行, 但是有一定局限性。但可以肯定的是, 基于 DNA 序列分析技术的 DNA 条码, 是一种实际可行和快速简便的物种鉴别方法, 代表了未来物种鉴别研究的发展趋势。

参考文献:

- [1] 梁宏伟, 邹桂伟, 罗相忠, 等. 3 种中国鲤 mtDNA D-Loop 序列的多态性与系统进化研究[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2009(3): 55-59.
- [2] Hebert P D 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.
- [3] Hebert P D N, Penton E H, Burns J M, et al. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*[J]. Proc Natl Acad Sci, 2004, 101(41): 14812-14817.
- [4] Pfenninger M, Nowak C, Kley C, et al. Utility of DNA taxonomy and barcoding for the inference of larval community structure in morphologically cryptic Chironomus (Diptera) species[J]. Mol Ecol, 2007, 16(9): 1957-1968.
- [5] 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, 12(35): 60-61.
- [6] 程希婷, 王爱民, 顾志峰, 等. DNA 条形码研究进展[J].

- 基因组学与应用生物学, 2011, 30(6): 748–758.
- [7] 律迎春, 左淘, 唐庆娟, 等. 海参 DNA 条形码的构建及应用[J]. 中国水产科学, 2011, 18(4): 782–789.
- [8] 郭昱嵩, 王中铎, 贾菠, 等. 南海常见 7 种石斑鱼的 DNA 条码构建与亲缘关系分析[J]. 现代农业科学, 2009, 16(5): 201–205.
- [9] 姚雪, 于丹, 王绪敏, 等. 大型海洋藻类 DNA 条形码技术的开发与应用[J]. 应用技术, 2011, 1(2): 161–162.
- [10] 王中铎, 郭昱嵩, 陈荣玲, 等. 南海常见硬骨鱼类 COI 条码序列[J]. 海洋与湖沼, 2009, 40(5): 608–614.
- [11] 王中铎, 郭昱嵩, 李路, 等. 笛鲷属鱼类 DNA 分子条码、系统进化和成种机制[J]. 中国科学, 2010, 40(6): 516–521.
- [12] 白庆利, 刘明华, 尹洪滨, 等. 高寒鲤染色体核型分析[J]. 水产学杂志, 1999, 12(1): 47–49.
- [13] 贾智英, 李飞, 李池陶, 等. 松浦鲤保护群体遗传结构研究[J]. 华北农学报, 2011 (1): 29–34.
- [14] 沈俊宝, 刘明华. 蓝色鳞鲤品系的起源、筛选和培育[J]. 淡水渔业, 1988(4): 3–6.
- [15] 刘明华, 沈俊宝, 王强, 等. 松浦镜鲤(散鳞镜鲤/德国镜鲤)F1 主要经济性状及遗传特性[J]. 水产学杂志, 1993, 6(1): 19–25.
- [16] 长江水产研究所育种室. 鲤新品种-红镜鲤选育简报[J]. 淡水渔业科技杂志, 1977(4): 25.
- [17] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术[M]. 第 2 版. 北京: 中国协和医科大学出版社, 1999 .
- [18] Ward R D, Zemlak T S, Innes B H, et al. DNA barcoding Australia's fish species[J]. Philosoph Trans Royal Soc, 2005, 360 (1462) B: 1847–1857.
- [19] 何继满. 分支系统学的外群分析方法中外群性状状态确定的探讨[J]. 动物学报, 43 (1): 108–109, 1997.
- [20] Librado P, Rozas J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data[J]. Oxford J Bioinform, 2009, 25(1): 1451–1452.
- [21] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0[J]. Mol Biol Evol, 2007, 24(8): 1596–1599.
- [22] Srivathsan A, Meier R. On the inappropriate use of Kimura-2-parameter (K2P) divergences in the DNA-barcoding literature[J]. Cladistics, 2012, 28(2): 190–194.
- [23] Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis[J]. Evol Bioinform, 2005, 1: 47–50.
- [24] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. Mol Biol Evol, 1987, 4(4): 406–425.
- [25] 欧阳小艳, 莫帮辉, 余华丽, 等. DNA 条形码识别—DNA 条形码与 DNA 芯片识别蚊媒准确性的比较[J]. 中国国境卫生检疫杂志, 2007, 30(6): 349–352 .
- [26] 伍献文. 中国理科鱼类志[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1982: 12.
- [27] 董金苟, 吴清江. 三个鲤品种线粒体基因片段序列保守性[J]. 水生生物学报, 2001, 25(1): 54–60.
- [28] Fedorov A, Saxonov S, Gilbert W. Regularities of context-dependent codon bias in eukaryotic genes[J]. Nucl Acids Res, 2002, 30(5): 1192–1197.
- [29] 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 .
- [30] 陈念, 赵树进. 入侵种的 DNA 条形码鉴定[J]. 生物技术通讯, 2009, 20(1): 135–137.
- [31] 韦媛媛, 彭金霞, 房振峰, 等. 卵形鲳鲹线粒体 COI 基因全长序列的克隆与分析[J]. 西南农业学报, 2011, 24(4): 1552–1557.
- [32] Hebert P D N, Ratnasingham S, Jeremy R W. Barcode animal life: cytochrome oxidase subunit I divergences among closely related species[J]. Proc Royal Soc London B: Biol Sci, 2003, 270(1): 96–99.

Study of DNA barcoding and genetic variation based on the mitochondrial COI gene sequences in five carp varieties

SHAN Yunjing^{1,2}, LU Cuiyun¹, LI Chao¹, ZHANG Mingzhao¹, GU Ying¹, SUN Xiaowen¹

1. Heilongjiang Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China;

2. College of Fisheries and Life Science, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China

Abstract: The mitochondrial COI gene of five cyprinoid aquaculture varieties were sequenced and their genetic diversity and cluster analysis were compared. Eight haplotypes were detected from 100 individuals, of which 94.06 % belonged to five haplotypes (H1, H2, H4, H5, H6). *Cyprinus carpio blue var* has only one haplotype, *C. c.* Red mirror carp has two haplotypes, and the other varieties including *Cyprinus carpio* Frigid carp, *C. c.* Songpu carp and *C. c.* Songpu mirror carp had five. Haplotype diversity (H_d) was $0.160 \pm 0.070 \sim 0.811 \pm 0.055$, the highest H_d frequency was observed in Frigid carp. The AMOVA and cluster analysis revealed that genetic distance between varieties (50.28%) was a little higher than that within varieties (49.72%), and the F_{ST} ranged from 0.711 4–0.831 2. Compared with the others varieties, *Cyprinus carpio blue var* exhibited the biggest differences. According to the evolutionary tree based on genetic distance, five varieties could be divided into three groups, the first group included Frigid carp and Red mirror carp, the second included Songpu mirror carp and Songpu carp, and the last included *Cyprinus carpio blue var*. With the exception of *Cyprinus carpio blue var*, all varieties shared the same haplotypes (H2, H4, H5, H6), which may be due to cross breeding. This study also indicated that DNA barcoding is a practical tool for analyzing the hereditary of different varieties. However, some limitations still exist.

Key words: cyprinoid aquaculture breeds; genetic diversity; DNA barcode; COI gene

Corresponding author: SUN Xiaowen. E-mail: sunxw2002@163.com