

## 我国 32 种鸟类 DNA 条形码分析

马明义<sup>1</sup>, 闫颖<sup>1</sup>, 王译伟<sup>1</sup>, 李静<sup>2\*</sup>, 蔡延森<sup>1\*</sup>, 李佳凌<sup>1</sup>

(1. 泸州医学院, 四川泸州 646000; 2. 四川大学生命科学学院, 四川省濒危野生动物保护生物学重点实验室, 成都 610064)

**摘要:** DNA 条形码是一种分子分类方法, 近年来在物种鉴定方面得到迅速的发展和广泛应用。本研究分析了我国 27 属 32 种鸟类 (61 只) 的线粒体细胞色素 c 氧化酶亚基 I (CO I) 基因的条形码片段, 分别用阈值法、聚类法和诊断核苷酸进行了分析, 探究 DNA 条形码鉴定我国鸟类的准确性。结果显示, 种内 CO I 序列变异很小, 种间存在较多的变异位点, 种间的遗传距离显著大于种内的遗传距离, DNA 条形码序列能够鉴定所有鸟类。

**关键词:** DNA 条形码; CO I; 动物; 物种鉴定

**中图分类号:** Q959.7; Q75 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7083(2012)05-0729-05

## A Study of DNA Barcoding on 32 Species of Bird in China

MA Ming-yi<sup>1</sup>, YAN Ying<sup>1</sup>, WANG Yi-wei<sup>1</sup>, LI Jing<sup>2\*</sup>, CAI Yan-sen<sup>1\*</sup>, LI Jia-ling<sup>1</sup>

(1. Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan Province 646000, China; 2. Key Laboratory of Conservation Biology on Endangered Wildlife, Sichuan Province, College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

**Abstract:** DNA barcoding has been proposed as a promising tool for the rapid species identification in a wide range of animal taxa. In this study, the ~648 bp mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I (CO I) gene of 61 individuals from 32 bird species was analyzed. By applying three methods (distance based method, monophyly-based method, and diagnostic characters), our result shows that CO I is able to distinguish all species studied. The present study validated the effectiveness of barcoding for the identification of birds.

**Key words:** DNA barcode; CO I; animal; species identification

鸟类对维持人类所赖以生存的生态系统的物质生产力、结构稳定性等有重要作用。比如, 处于食物链中间的雉鸡类, 既要取食各种植物、小动物, 又要被其它大型动物捕食, 在维持自然生态系统的平衡方面占有重要作用。因此, 对鸟类的物种多样性保护是非常必要的。

物种的准确鉴别对生物多样性保护工作至关重要 (Hajibabaei *et al.*, 2007)。传统上, 对鸟类的野外识别主要依靠它们的形态特征 (如体形大小和身体各部位的比例、嘴形、翼形、尾形等)、羽色特征 (除体羽的主要颜色外, 还有头部、翅膀、尾羽和身体其他部位的特殊斑纹等)、飞翔特征 (翱翔、滑翔、盘旋、直线飞行、空中停留、垂直起落、振翅的方式等)、鸣叫特征 (低沉、高亢、尖厉、嘶哑等) 等各方面的特点 (李湘涛, 2004a, 2004b)。而在实际工作中, 对鸟类的辨认则有一定难度, 比如有些鸟类羽色变异很大, 有些鸟类雌雄个体的体型差异明显, 有些种类幼

鸟、亚成鸟、成鸟的雌雄鸟之间羽色、条纹差异明显, 甚至有些种类羽色还有深色型、浅色型和中间型等不同的色型 (李湘涛, 2004a, 2004b)。可见, 对鸟类的准确鉴别是一项专业性很强、难度很大的工作, 而目前我们也面临着专门从事鸟类资源调查、研究和保护的专业人员少, 研究经费不足等问题。为了更好地满足鸟类学研究工作和自然保护事业发展, 有必要开展对鸟类的分子鉴定工作。

DNA 条形码是一种分子分类方法。该技术通过对一段标准化的基因片段 (动物界为 648 bp 的 CO I 基因片段) 进行序列分析 (Robert, 2005), 能有效地进行物种鉴定和发现隐存分类单元 (Hebert *et al.*, 2003)。这一技术在鸟类中的应用尤其成功 (Hebert *et al.*, 2004; Yoo *et al.*, 2006; Kerr *et al.*, 2007, 2009), 它能弥补传统形态分类的不足 (如专业性太强、难以发现隐存种、受制于表型可塑性和发育阶段等), 为社会基层的各项工作, 如生物多样性

收稿日期: 2012-02-05 接受日期: 2012-07-07

作者简介: 马明义 (1971 ~), 男, 博士, 副教授, E-mail: luyimamingyi@163.com

\* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: ljtf71@hotmail.com, cys\_cys@yahoo.cn

保护、种群管理、动物制品生产销售等,提供规范、便捷、准确的物种鉴定方法(莫邦辉等,2008)。DNA 条形码自问世以来发展十分迅速,现已成为生物分类学研究的热点和进展最迅速的前沿学科之一。目前国内鸟类的 DNA 条形码研究主要集中在一些雀形目、鸡形目鸟类(Cai *et al.*, 2010; 戴传银等, 2010)、猛禽(蔡延森等,2009)以及部分我国地方品种鸡(屠云洁等,2011)、鸭(徐向明,2008; 虞德兵等,2011)等。已有一些学者将 DNA 条形码应用于检测撞机鸟类(Yang *et al.*, 2010),为机场提供针对性的防治措施。

本研究对 32 种鸟类的 DNA 条形码序列进行了分析,分别用阈值法(threshold, distance based method)、聚类法(monophyly, clusters based method)和诊断核苷酸(diagnostic nucleotides)(Desalle *et al.*,

2005)进行了分析,探究 DNA 条形码鉴定我国鸟类的可靠性。

## 1 实验材料与方法

本研究分析了 7 目 11 科 27 属 32 种 61 个个体的 CO I 序列,其中 10 种 12 条序列为本研究新扩增获得(表 1),另外 22 种 49 条序列来自我们早期研究(GenBank accession numbers: GQ922603 ~ GQ922651)。样本为 2005 年以来采自四川省内及周边各省的鸟类肌肉、肝脏、血液及羽毛样品,均于 -80℃ 冷冻或 -80℃ 浸泡于 95% ~ 100% 乙醇中冷冻保存。

DNA 提取采用常规方法(Sambrook *et al.*, 1989)。PCR 扩增使用的引物源自 Kerr 等(2007),为 BirdF1: TTCTCCAACCACAAAGACATTGGCAC; BirdR1: ACGTGGGAGATAATTCCAAATCCTG; FalcoFa:

表 1 样本信息  
Table 1 Sample information

中文名 Chinese name	学名 Scientific name	样品编号 Sample No.	样品采集地/登录号 Sample collection/GenBank accession numbers
比氏鹇鸲	<i>Seicercus valentini</i>	BSWY3	四川雷波县嘛咪泽
苍鹭	<i>Ardea cinerea</i>	CL1	四川省屏山县
大斑啄木鸟	<i>Dendrocopos major</i>	DBZMN	甘肃省白银
董鸡	<i>Gallix cinerea</i>	DJ1	四川大学望江校区
灰鹤	<i>Grus grus</i>	HH1	四川省理塘林业局
黑颈鹤	<i>Grus nigricollis</i>	HJH1、HJH2	四川省若尔盖四川省美姑县洪溪镇
小白鹭	<i>Egretta garzetta</i>	XBL1	四川成都
蓝额红尾鸲	<i>Phoenicurus frontalis</i>	Lehwj1	四川省雷波嘛咪泽拉咪乡
契尾伯劳	<i>Lanius sphenocercus</i>	QWBL	甘肃省白银
寿带	<i>Terpsiphone paradisi</i>	SD1、SD2	四川省广元市梓潼县
白腹锦鸡	<i>Chrysolophus amherstiae</i>	BFJJ1、2、14、15、A、B、C、D	GQ922603 ~ GQ922610
白孔雀/蓝孔雀	<i>Pavo cristatus</i>	BKQ1、2、LKQ1	GQ922611、GQ922612、GQ922638
白马鸡	<i>Crossoptilon crossoptilon</i>	BMJ1、2	GQ922613、GQ922614
白尾鹇	<i>Circus cyaneus</i>	BWY5、6、7	GQ922615 ~ GQ922617
白鹇	<i>Lophura nycthemera</i>	BX4、5、Z	GQ922618 ~ GQ922620
家鸡	<i>Gallus gallus domesticus</i>	chicken	GQ922621
苍鹰	<i>Accipiter gentilis</i>	CY1、3、9、10	GQ922622 ~ GQ922625
短耳鸮	<i>Asio flammeus</i>	DEX15	GQ922626
大鸮	<i>Buteo hemilasius</i>	DK12、16	GQ922627、GQ922628
雕鸮	<i>Bubo bubo</i>	DX14	GQ922629
红腹锦鸡	<i>Chrysolophus pictus</i>	hfjj3、6、Z	GQ922630 ~ GQ922632
红腹角雉	<i>Tragopan temminckii</i>	HFJZ1、2、3	GQ922633 ~ GQ922635
灰胸竹鸡	<i>Bambusicola fytchii</i>	HXZJ1	GQ922636
四川林鸮	<i>Strix davidi</i>	LH13	GQ922637
蓝马鸡	<i>Crossoptilon auritum</i>	LMJ1、2	GQ922639、GQ922640
普通鸮	<i>Buteo buteo</i>	PTK12	GQ922641
雀鹰	<i>Accipiter nisus</i>	QY17	GQ922642
四川山鹧鸪	<i>Arborophila rufipectus</i>	SCSZG2、4	GQ922643、GQ922644
四川雉鸮	<i>Tetraophasis szechenyii</i>	SCZC5、11、Y	GQ922645 ~ GQ922647
血雉	<i>Ithaginis cruentus</i>	XZ1	GQ922649
勺鸡	<i>Pucrasia macrolopha</i>	SJ3	GQ922648
环颈雉	<i>Phasianus colchicus</i>	ZJ1、3	GQ922650、GQ922651

TCAACAAACCACAAAGACATCGGCAC; BirdR2: AC-TACATGTGAGATGATTCCGAATCCAG。每 25 μL PCR 反应体系包含: 约 25 ng DNA 模板, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 × PCR buffer (TaKaRa, 中国大连), 1.0 U Taq DNA 聚合酶 (TaKaRa, 中国大连), 上下游引物各 0.5 μM, 每种 dNTP 各 50 μM。PCR 反应参数: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 45 s, 51℃ 45 s, 72℃ 45 s, 共 35 个循环; 72℃ 最后延伸 10 min; 4℃ 保存。PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 用凝胶回收试剂盒 (E. Z. N. A. Gel Extraction Kit) 回收约 700 bp 目的片段, 回收产物均双向直接测序。

将所获正向、反向序列比对校正, 并在 NCBI 中用 Blast 进行相似性检索, 确定为 CO I 基因片段。用 MEGA 5 同小鼠线粒体 CO I 基因全序列进行比对, 截取对应于小鼠第 58 位到 705 位碱基的片段。遗传距离计算, 全部采用 K2P (Kimura 2-parameter) 距离; NJ 树 (Neighbor-Joining) 构建使用 K2P 模型; 使用 CAOS (Character Attribute Organization System) (Sarkar *et al.*, 2008; Bergmann *et al.*, 2009) 查找诊断核苷酸。

## 2 结果

总共分析了 32 种 61 个个体的 CO I 序列, 所有序列不含点套峰、插入或缺失以及终止密码子, 在 NCBI 中 Blast 进行相似性检索后, 均与各种鸟类的 CO I 基因匹配度最高, 表明所得序列为 CO I 条形码片段。

### 2.1 遗传距离分析

DNA 条形码序列的 K2P 遗传距离在种内变动范围为 0% ~ 1.1%, 平均为 0.06%; 同属种间遗传距离范围为 0.6% ~ 11.3%, 平均为 3.65%; 同科属间遗传距离范围为 8.9% ~ 21.6%, 平均为 14.82%。种内、同属种间、同科属间的遗传距离分布频率见图 1。

目前比较通用的鸟类阈值为 2.4% (Kerr *et al.*, 2009), 本研究所有鸟类的种内差异都小于该阈值, 而 94.4% (34/36) 的种间差异比对结果大于阈值, 可见阈值法能有效地鉴定物种。

### 2.2 聚类分析

使用 MEGA 5 构建 NJ 树, 绝大部分物种表现为同种个体聚类在一起形成独立的支系, 有很高的支持率, 表明可被准确鉴定 (图 2)。个别鸟类在 NJ 树上不形成单系 (鸢属), 这在我们早期研究中已有发现 (蔡延森等, 2009), 可能是近期分化导致的。

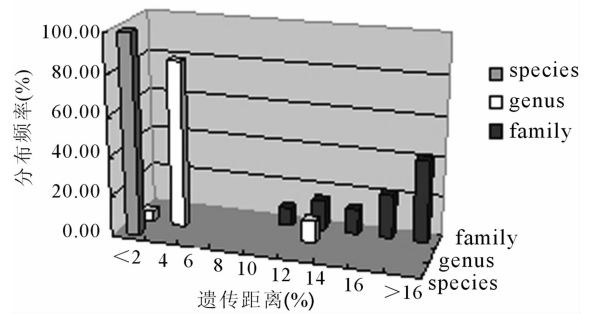


图 1 种内、同属种间、同科属间的遗传距离分布频率  
Fig. 1 Distribution of genetic distances within species, genus and family of birds

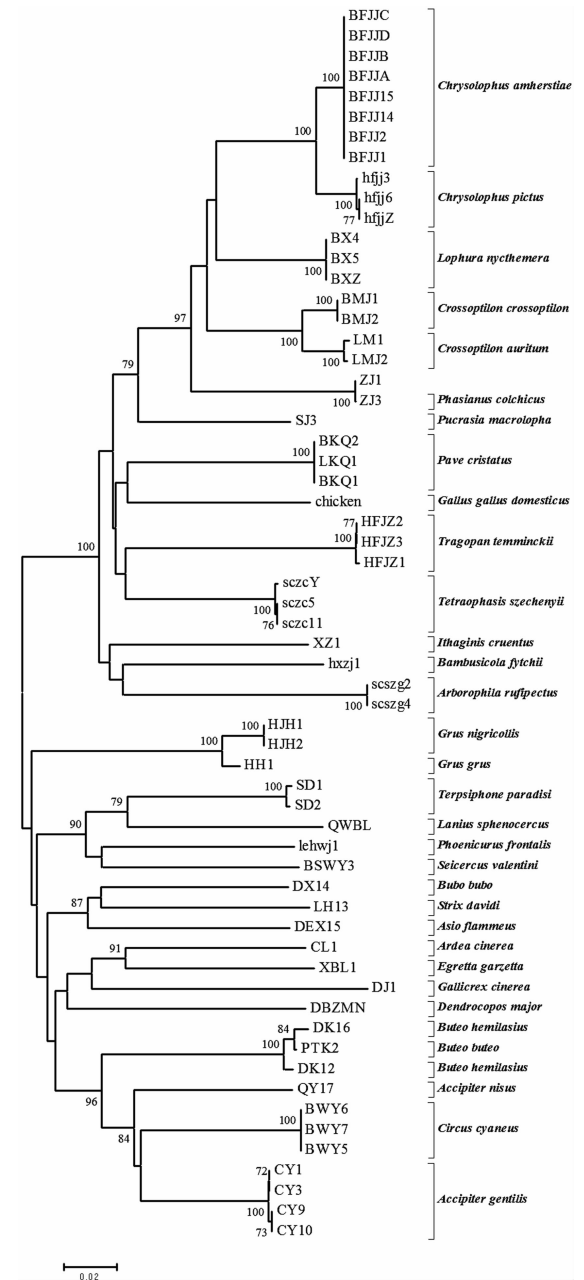


图 2 我国 32 种鸟类 61 个个体 DNA 条形码序列所构建的 NJ 树  
Fig. 2 Neighbor-Joining tree of 61 CO I sequences from 32 species of bird

### 2.3 诊断核苷酸分析

本研究 61 个个体的 32 种鸟类在 CO I 基因 648 bp 的条形码片段上共包含 257 个变异位点和 391 个保守位点。本研究共有 5 对同属物种,初步统计共有 2~61 个 sPu 诊断核苷酸(single pure character attributes)及 1~7 个 sPr 诊断核苷酸(single private character attributes)。但根据我们结合国外种群的研究数据,实际的 sPu 位点应为 0~61 个,sPr 位点 1~9 个,因为鸕属的 9 个位点实际上全部是 sPr(Cai *et al.*, 2010)。另外 4 对同属物种的 sPu 和 sPr 诊断核苷酸的情况为:鹤属的 13 个位点全部为 sPu;锦鸡属分别为 17 个和 1 个;马鸡属分别为 18 个和 2 个;鹰属分别为 61 个和 1 个(表 2,部分同属物种的 sPu 诊断核苷酸)。因此,可根据这些诊断核苷酸位点对

近缘鸟类进行鉴定。

### 3 讨论

在动物界,基于 CO I 基因片段的 DNA 条形码已经被证明是一种解决物种鉴定和分类问题有效的手段。近年来,国际上的鸟类条形码研究主要为较全面地大规模地区种群筛查,包括北美地区(Kerr *et al.*, 2007;)、朝鲜半岛(Yoo *et al.*, 2006)、新西兰和南极地区(Patel *et al.*, 2010)等。本研究用 DNA 条形码成功地对我国 32 种鸟类进行了鉴定,分别用阈值法、聚类法和诊断核苷酸探究了 DNA 条形码的准确性。结果表明,三种方法都能很有效地鉴定物种,但诊断核苷酸能更有效地区分近缘物种。

表 2 部分同属物种的 sPu 诊断核苷酸  
Table 2 sPu diagnostic nucleotides of partial congeneric species

种名	诊断核苷酸 Diagnostic nucleotides																	
	1	6	9	11	153	156	160	174	189	465	519	585	612					
<i>Grus grus</i>	C	C	C	G	T	G	A	G	A	A	T	T	T					
<i>G. nigricollis</i>	T	A	T	A	C	A	G	A	G	G	C	C	C					
<i>Chrysolophus amherstiae</i>	1	54	84	87	90	192	264	291	351	375	378	402	582	615	621	630	642	
	T	C	C	A	G	A	T	T	T	C	G	A	C	A	G	C	C	
<i>C. pictus</i>	C	T	T	G	A	G	C	C	C	T	A	G	T	G	A	T	T	
<i>Crossoptilon crossoptilon</i>	33	66	69	93	168	171	258	306	312	330	345	348	456	538	570	609	615	630
	T	A	A	T	T	G	C	A	C	C	C	C	G	T	G	C	A	T
<i>C. auritum</i>	C	G	G	C	C	A	T	G	T	T	A	T	A	C	A	T	G	C

阈值法基于 10 倍规则鉴定物种,即种间遗传距离要超过种内遗传距离的 10 倍;本研究中 K2P 平均遗传距离在种内为 0.06%、种间为 3.65%,相差 60 倍,表明了该方法的有效性。聚类法基于 NJ 树分析,观察同种个体是否在 NJ 树上聚在一起形成独立的支系并得到很高支持率,该方法在本研究中也很有效地区分不同物种,也证明了这种方法的有效性。由于阈值法和聚类法都比较依赖条形码间隔(barcoding gap),即最大种内距离同最小种间距离之间不应有重叠,而已有的研究表明这种过于理想化的遗传距离间隔在很多动物内群中并不存在(Moritz & Cicero, 2004; Meyer & Paulay, 2005; Wiemers & Fiedler, 2007),因此一些近缘物种的 K2P 遗传距离种间最小值可能大于种内最大值,在 NJ 树上会表现为形成嵌套,导致部分近缘物种不能准确鉴定。随着 DNA 条形码研究的不断深入、被研究的生物类群范围不断扩大,由此引起的近缘物种不能准确鉴定的情况逐渐增多。针对这种问题,有学者提出应使用多基因条形码,但这样无疑会使条形码

技术复杂化、专业化,违背了条形码建立的初衷。另一些学者则倾向于改变和更新分析处理数据的方法和手段,比如诊断核苷酸技术,或者以分类种群来代替地区种群进行研究(Desalle *et al.*, 2005; Sarkar *et al.*, 2008)。诊断核苷酸不依赖遗传距离,通过 CAOS 系统分析近缘种各自的 sPu 和 sPr 位点,体现不同物种之间的差别。本研究中所有近缘物种均可被 CAOS 识别,体现了该技术对近缘种鉴定的优势。

本研究在 Cai 等(2010)的研究基础上新增 10 种 12 个样本,进一步充实和拓展了我国的鸟类 DNA 条形码研究,结果表明 DNA 条形码能够对鸟类实现快速、准确的鉴定,可在很大程度上促进动物分类学以及分子鉴定的快速发展,能有效地支持生物多样性保护工作。

### 4 参考文献

- 蔡延森,张修月,岳碧松,等. 2009. 我国 8 种猛禽的 DNA 条形码技术研究[J]. 四川动物, 28(3): 334~340.  
戴传银,张瑞莹,尹祚华,等. 2010. 部分山雀科鸟类的 DNA 条形

- 码与物种识别[J]. 动物分类学报, 35(4): 835~841.
- 李湘涛. 2004a. 中国雉鸡[M]. 北京: 中国林业出版社.
- 李湘涛. 2004b. 中国猛禽[M]. 北京: 中国林业出版社.
- 莫帮辉, 屈莉, 韩松, 等. 2008. DNA 条形码识别 I. DNA 条形码研究进展及应用前景[J]. 四川动物, 27(2): 303~306.
- 屠云洁, 高玉时, 苏一军, 等. 2011. 我国部分地方鸡种 CO I 基因多态性及其分子系统进化研究[J]. 安徽农业大学学报, 38(1): 39~42.
- 徐向明. 2008. 我国 3 个地方品种鸭线粒体 DNA CO I 基因的 DNA 条形码初步分析[J]. 畜牧与兽医, 40(11): 51~53.
- 虞德兵, 陆应林, 徐昊翔, 等. 2011. 基于线粒体 CO I 基因序列分析家鸭系统发育关系[J]. 南京农业大学学报, 34(6): 109~114.
- Bergmann T, Hadrys H, Breves G, *et al.* 2009. Character-based DNA barcoding: a superior tool for species classification[J]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, 122: 446~450.
- Cai Y, Yue B, Jiang W, *et al.* 2010. DNA barcoding on subsets of three families in Aves[J]. *Mitochondrial DNA*, 21(3-4): 132~137.
- DeSalle R, Egan MG, Siddall M. 2005. The unholy trinity: Taxonomy, species delimitation and DNA barcoding[J]. *Phil Trans R Soc B Biol Sci*, 360(1462): 1905~1916.
- Hajibabaei M, Singer GAC, Clare EL, *et al.* 2007. Design and applicability of DNA arrays and DNA barcodes in biodiversity monitoring[J]. *BMC Biology*, 5: 24.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, *et al.* 2003. Biological identifications through DNA barcodes[J]. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 270: 313~321.
- Hebert PDN, Stoeckle MY, Zemlak TS, *et al.* 2004. Identification of birds through DNA Barcodes[J]. *PLoS Biol*, 2(10): e312.
- Kerr KCR, Stoeckle MY, Dove CJ, *et al.* 2007. Comprehensive DNA barcode coverage of North American birds[J]. *Mol Ecol Notes*, 7(4): 535~543.
- Kerr KCR, Lijtmaer DA, Barreira AS, *et al.* 2009. Probing evolutionary patterns in neotropical birds through DNA barcodes[J]. *PLoS ONE*, 4(2): e4379.
- Meyer CP, Paulay G. 2005. DNA barcoding: Error rates based on comprehensive sampling[J]. *PLoS Biol*, 3(12): e422.
- Moritz C, Cicero C. 2004. DNA barcoding: Promise and pitfalls[J]. *PLoS Biol*, 2(10): e354.
- Patel S, Wauqh J, Millar CD, *et al.* 2010. Conserved primers for DNA barcoding historical and modern samples from New Zealand and Antarctic birds[J]. *Mol Ecol Resour*, 10(3): 431~438.
- Robert Hanner. 2005. Proposed Standards for BARCODE Records in INSDC (BRIs) [S]. Database Working Group, Consortium for the Barcode of Life.
- Sambrook JF, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. Molecular cloning, a laboratory manual, 2nd ed[M]. New York, Cold Spring Harbor: Laboratory Press.
- Sarkar IN, Planet PJ, DeSalle R. 2008. CAOS software for use in character-based DNA barcoding [J]. *Mol Ecol Resources*, 8: 1256~1259.
- Wiemers M, Fiedler K. 2007. Does the DNA barcoding gap exist? A case study in blue butterflies (Lepidoptera: Lycaenidae) [J]. *Frontiers Zool*, 4: 8.
- Yang R, Wu X, Yan P, *et al.* 2010. Using DNA barcodes to identify a bird involved in a birdstrike at a Chinese airport[J]. *Mol Biol Rep*, 37(7): 3517~3523.
- Yoo HS, Eah JY, Kim JS, *et al.* 2006. DNA barcoding Korean birds [J]. *Mol Cells*, 22(3): 323~327.