

大豆线粒体细胞色素 b 基因的克隆及系统分析

李玉秋, 赵洪锬, 刘晓东, 张春宝, 董英山

(吉林省农业科学院 生物技术研究中心, 吉林 长春 130033)

摘要: 根据实验室测序的大豆线粒体基因组片段设计线粒体细胞色素 b (Cytochrome, *cob*) 基因特异引物, PCR 扩增获得 1 173 bp 大豆 (JLGM-1B) 线粒体 *cob* 基因保守区序列。经序列分析, 该基因编码 391 个氨基酸, A + T 含量 58.1%, G + C 含量 41.9%。Southern 杂交表明 *cob* 基因在栽培大豆线粒体基因组中至少有 2 个拷贝。氨基酸序列及系统进化树分析表明, 大豆与其它植物的 *cob* 基因具有较高的同源性, 与双子叶作物同源性高达 98%, 其分类地位与传统系统分类地位相吻合, 说明 *cob* 基因具有较高的保守性, 可以作为分子系统分类学潜在的遗传分化标记。

关键词: 大豆; 线粒体; 细胞色素 b

中图分类号: Q941 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-9841(2011)05-0738-05

Cloning and Phylogenetic Analysis of Mitochondrial Cytochrome b Gene from Soybean (*Glycine max*)

LI Yu-qiu, ZHAO Hong-kun, LIU Xiao-dong, ZHANG Chun-bao, DONG Ying-shan

(Biotechnology Research Center, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130033, Jilin, China)

Abstract: In this study, mitochondrial DNA uncompleted sequence was used to design special prime of mitochondrial cytochrome b gene (*cob*) and obtained conservation domain of soybean *cob* gene by PCR amplification. The results showed that *cob* gene was consisted by 1 173 bp which encoded 391 amino acids, with 58.1% A + T and 41.9% G + C content. Southern blot analysis revealed that more than 2 *cob* gene copies were found in *G. max* mitochondrial genome. Amino acid sequence and phylogenetic analysis showed that *cob* was most similar to the dicotyledon, with 98% identity at the nucleotide level. In conclusion, *cob* gene is a potential hereditary marker for phyletic classification basing on its highly conservative property.

Key words: Soybean; Mitochondrial; Cytochrome b

线粒体是一种半自主性细胞器, 是细胞进行呼吸活动、产生能量的重要场所。线粒体 DNA (mtDNA) 分子量小, 结构简单, 具有严格的母性遗传方式, 几乎不发生重组, 进化速度快, 是分子系统学研究和群体遗传分析的重要标记, 在探讨品种起源及分化、种间的系统演化、种内母系演化、地方品种资源与地理分布关系等方面具有广泛的应用, 其中细胞色素 b 基因 (cytochrome b, *cob*) 在系统发育研究中应用最广^[1-4]。*cob* 基因是线粒体自身编码的为数不多的基因之一, 它在呼吸链的电子传递中起着重要作用, 由于其序列测定容易进行、含有高分辨率的系统发育信息及在生物类群中存在范围极广等特点而被认为是探讨近缘物种间遗传分化的良好标记, 对系统进化和分类研究有较强的适用性, 广泛用于动物界的系统发育分析^[5-9]。

大豆是重要的粮食和油料作物, 在我国国民经济发展中占有重要地位。大豆的起源与进化研究,

是大豆基础生物学的一个重要方面, 也是大豆种质资源研究的核心问题。了解大豆的起源与进化, 可以科学地指导大豆种质的搜集、分类、研究和利用^[10]。该研究克隆获得大豆线粒体 *cob* 基因, 对其核酸序列及其在线粒体基因组中的拷贝数进行分析和验证, 并构建了进化树, 对大豆在 22 种植物中的分类地位进行比较分析, 旨在研究 *cob* 基因作为遗传分类标记在植物学中的应用。

1 材料与amp;方法

1.1 试验材料

1.1.1 植物材料 大豆 JLGM-1B, 由吉林省农业科学院大豆研究中心赵丽梅研究员馈赠。

1.1.2 试验试剂 IPTG、X-Gal 购自 Biolabs 公司; rTaq DNA 聚合酶、dNTPs、克隆载体 pMD18-T 购自大连宝生物工程公司; 2 × Mix Taq (DNA 聚合酶) 购自于 TIANGEN 生物有限公司; UNIQU-10 柱式 DNA

收稿日期: 2011-06-21

基金项目: 国家转基因重大专项资助项目 (2008ZX08004-004); 国家自然科学基金青年基金资助项目 (31000141); 国家高技术研究发展计划重点资助项目 (2006AA10Z120, 2011AA10A105)。

第一作者简介: 李玉秋 (1979-), 女, 硕士, 研究实习员, 研究方向为生物技术。E-mail: lyqhb1@126.com。

通讯作者: 董英山 (1963-), 男, 博士, 研究员, 研究方向为植物生物技术。E-mail: ysdong@cjaas.com。

胶回收试剂盒购自上海生工生物技术公司;大肠杆菌 DH5 α 为实验室保存;Nylon 膜、DIG-High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II 购自 Roche 公司;其余试剂为国产分析纯或化学纯。

1.2 试验方法

1.2.1 黄花苗的培养 取大小均一、无病虫害大豆种子 20 粒,用清水冲洗干净将其均匀放在 3 层发芽纸中(下面两层,上面一层);从一端卷起,两端用束带扎起,防止豆种散落,放入装有 150 mL 清水的 500 mL 烧杯中,上蒙罩一层黑色塑料纸用于遮光和防止水分过分蒸发,置于恒温箱于 27 $^{\circ}$ C 暗培养 5~7 d(每天更换烧杯内水源),取植株长约 10 cm(不包括根)左右的黄化幼苗作为试验材料。

1.2.2 引物设计 以实验室已测序的栽培大豆线粒体基因组片段(待发表)为模板,采用 Primer Premier 5 软件分析设计特异引物,由北京六合华大基因研究中心合成:

上游特异引物 *cob*-F:

5'-ATGCTAACGGGCTGGAATC-3'

下游特异引物 *cob*-R:

5'-CCTCTTCCAACCTCGTCCCG-3'

1.2.3 高纯度线粒体 DNA(mtDNA)提取 取 27 $^{\circ}$ C 暗培养 5~7 d 的大豆黄化苗,参照曾秀存等^[11]的方法,用差速离心与蔗糖密度梯度离心结合的方法提取高纯度的线粒体 DNA。质量和浓度确定采用琼脂糖凝胶电检测。

1.2.4 *cob* 基因克隆与测序 以提取的 mtDNA 为模板,以 TIANGEN 公司 2 \times Mix Taq 反应说明进行 PCR 扩增。反应程序:94 $^{\circ}$ C 4 min、94 $^{\circ}$ C 30 s、55 $^{\circ}$ C 45 s、72 $^{\circ}$ C 90 s、30 个循环、72 $^{\circ}$ C 10 min,反应终止于 4 $^{\circ}$ C。扩增反应在 Biometra UNOII PCR 仪上进行。

在紫外灯下切出含有目的 DNA 的琼脂糖凝胶,采用 UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒回收 PCR 产物。经回收纯化后的 PCR 产物,亚克隆到载体 pMD18-T 上,并将其转化到大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中,经蓝、白斑筛选、菌落 PCR 及酶切检测后鉴定为正确的重组质粒,送北京六合华大基因研究中心进行序列测定。

1.2.5 序列分析 采用 Vector NTI 8.0 软件对序列进行拼接与分析。结合 Vector NTI 8.0、GENEDOC、Mega 3.1 软件以 Kimura-2 parameter 模型计算遗传距离,采用邻接法(Neighbor Joining, NJ)构建系统进化树,系统树分支置信度采用重复抽样分析(Bootstrap analysis)方法,重复抽样的次数为 1 000 次。大于 50% 的 bootstrap 标注在图上。

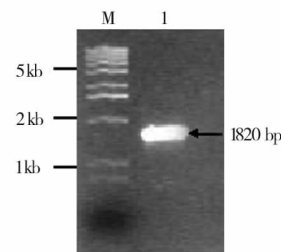
1.2.6 栽培大豆 *cob* 基因拷贝数的分析 分别取

上述方法提取的栽培大豆 mtDNA 20 μ g,使用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Hind* III 进行酶切。将酶切完全的基因组 DNA 转移到带正电荷的尼龙膜上,参照《分子克隆实验指南》方法^[12],以 *cob* 的 ORF 区 400 bp 片段为探针,用 DIG 进行标记,其中标记、杂交、洗膜及显影按照 DIG-High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II 说明书步骤进行,最后照相机拍照保存。

2 结果与分析

2.1 *cob* 基因扩增及序列分析

以实验室已测序栽培大豆(JLGM-1B)线粒体 DNA 为模板,以 *cob*-F 和 *cob*-R 为引物,PCR 扩增获得长约为 1 820 bp 的特异谱带(图 1)。将扩增产物克隆到 pMD18-T 载体中转化大肠杆菌 DH5 α ,PCR、酶切验证结果正确后送交北京六合华大基因研究中心测序。



M:1kb Marker, 1. *cob* 基因

M:1kb Marker, 1. *cob* gene

图 1 *cob* 基因 PCR 扩增电泳图

Fig. 1 PCR amplified electrophoresis of *cob* gene

测序获得长为 1 820 bp 序列,采用 Vector NTI 8.0 对测序结果进行分析(图 2)。结果表明 1 173 bp 为 *cob* 基因的保守编码区,编码 391 个氨基酸,理论分子量 44.3 kDa,等电点(PI)7.06。*cob* 基因序列中 A、G、T 和 C 碱基平均含量分别为 22.4% (263 个)、21.5% (252 个)、35.6% (418 个)和 20.5% (240 个)。其中 A + T 含量 58.1%,G + C 含量 41.9%,A + T 含量明显高于 G + C 含量,该结果与高等植物 mtDNA 碱基组成(G + C 百分比在 37%~50% 之间)相一致。将推断的编码序列在 NCBI 上进行氨基酸序列保守结构域分析表明,该基因属于细胞色素 bc1 家族,其氮端含有多个亚铁血红素结合位点和泛素结合位点。

2.2 *cob* 基因 Southern 杂交分析

提取栽培大豆线粒体 DNA 分别经限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切。以 DIG 标记的 *cob* ORF 区 400 bp 片段做为探针,进行 Southern blot(图 3)。

M R N Q R F S L L K E P I S S T L N Q H
 1 ATGAGGAACCAACGATTCTCTCTTCTAAAGAACCTATATCTCCACACTTAATCAACAT
 L I D Y P T P S N L S Y W U G F G S L A
 61 TTGATAGATTATCCAACCCGAGCAATCTTAGTATTGGTGGGGCTTCGGTTCGTAGCT
 G I C L V I Q I V T G V F L A H H Y T P
 121 GGTATTGTGTTAGTCATTAGACTAGTACTGCTGGCTTTTITTAGCTATGCATTACACACT
 H V D L A F N S V E H V H R D V E G G W
 181 CATGTGGATCAGCTTCAACAGCTGAGAACAGCTTATGAGAGATGTTGAGGGGGCTGG
 L L R Y H H A N G A S H F L I V V H L H
 241 TTGCTCCGTATATGCATGCTAATGGGCAAGTATGTTTTCATTGTGGTTACCTTCAT
 I F R G L Y H A S Y S S P R E F V R C L
 301 ATTTTTCGTGGTCTATATCATGCGAGTTATAGCACTCCTAGGGAATTTGTTGGTGTCTC
 G V V I F L L M I V T A F T G Y V L P W
 361 GGAGTTGTAATCTTCCTATTAATGATTGTGACAGCTTTTACAGGATACGTAACCTTGG
 G Q M S F W G A T V I T S L A S A I P V
 421 GGTACAGATGAGCTTTTGGGAGCTACAGTAATTAAGCTTACGTAAGCCATACCTGTA
 V G D T I V T W L W G G F S V D N A T L
 481 GTAGGAGATACCAGTACTGGCTTGGGTTGGTTCCTCGTGGACAATGCCACTTA
 N R F F S L H H L L P F L L V G A S L L
 541 AATCGTTTTTGTAGTCTCATCTTACTCCCTTTCTTTAGTAGCGCCAGCTCTCTT
 H L A A L H Q Y G S N N P L G V H S E M
 601 CATCTGGCCGATTCAGCAATATGGATCAATAATCCATTGGGTGTACATTACAGAGATG
 D Q I S F Y P Y F Y V K D L V G W V A F
 661 GATCAAAATTTCTTTTACCTTATTTTATGTAAAGGATCTAGTAGTTGGGTAGCTTTT
 A I F F S I W I F Y A P N V L G H P D N
 721 GCTATCTTTTTCCATTTGGATTTTATGTGCTCAATGTTTGGCCATCCCGACAAT
 Y I P A N P M P T P P H I V P E U Y F L
 781 TATATACCTGTAATCCGATGCCACCCGCTCATATTGTGCCGGAATGGTATTTCCTA
 P I H A I L R S I P D K S G G V A A I A
 841 CCGATCCATGCCATTCTCTAGTATACCTGACAAATCGGGAGGTGTAGCCCAATAGCA
 P V F I C L L A L P F F K S H Y V R S S
 901 CCAGTTTTTATATGCTCTGTTGGCTTACCTTTTAAAAAGTATGACGTGCGTAGTTCA
 S F R P T H Q G I F W L L A D R L L L
 961 AGTTTTTCGCCCTATTCACCAAGGAATATTTGGTGCCTTTGGCGGATCGCTTACTACTA
 G W I G C Q P V E A P F V T I G Q I P P
 1021 GGTGGATCGGATGCAACTGTGGAGCCACTTTTGTACTATTGACAAATTCCTCTC
 F V F L F F A I T P I P G R V G R G I
 1081 TTTGTTTTCTTTGTTCTTGGCATAACGCCAATCCGGGACAGATTGGAAGAGGAATT
 P N S Y T D E T D Q *
 1141 CCGAATTCCTACACCGATGAGACTGATCACTGA

图2 栽培大豆cob的核苷酸序列及其推导的氨基酸序列
 Fig.2 Sequence for nucleotide and presumed amino acid of cob gene in soybean

由图3可知,BamH I酶切泳道显现3条较明显条带,Hind III酶切泳道显现5条较明显条带。由于BamH I在cob基因序列中不存在酶切位点,基因拷贝数即为杂交结果中出现的条带数;Hind III在cob序列中只存在1个酶切位点,杂交结果中条带数应为拷贝数的2倍,而Hind III酶切杂交结果显示5条较明显条带,由此推断cob基因在大豆线粒体基因组中至少存在2个拷贝。

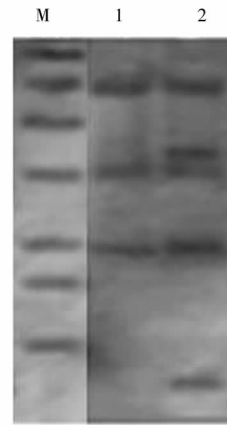
表1 大豆与21种植物cob基因核酸序列及推测的氨基酸序列同源性比较

Table 1 Homology analysis of cob gene nucleic acid sequences and deduced amino acid sequences of soybean with 21 other species

核酸序列 Nucleotide accession No.	氨基酸序列 Amino acid accession No.	物种 Source	线粒体 DNA mtDNA/bp	同源性 Identity/%	氨基酸 Acid amino	同源性 Identity/%
JF437888	—	Glycinemas 大豆	1173	100	391	100
X07237	—	Vicia faba 蚕豆	1182	98	393	—
AJ132231	—	Pisum sativum 豌豆	1182	98	393	—
DQ984518	—	Sorghum bicolor 高粱	1167	95	389	—
AY506529	YP 588373	Zea mays 玉米	1167	95	389	93
AP008982	AAK37519	Triticum aestivum 小麦	1197	96	399	93
BA000029	YP 514668	Oryza sativa 水稻	1194	95	398	93
GU253304	—	Allium cepa 洋葱	1191	96	397	—
EU431224	YP 002608212	Carica papaya 番木瓜	1182	97	394	96
GQ856147	YP 003587348	Citrullus lanatus 西瓜	1173	98	391	94
AY305265	ADA85894	Cucumis melo 香瓜	1167	96	389	93
GQ856148	YP 003587348	Cucurbita pepo 西葫芦	1173	97	391	94
HM535787	ADP20669	Hibiscus cannabinus 红麻	1179	97	393	96
X07126	—	Oenothera 月见草	1185	97	395	—
HQ874649	—	Ricinus communis 蓖麻	1173	98	391	—
AF095281	CAA41343	Solanum tuberosum 马铃薯	1137	96	379	95
HM367685	YP 004222814	Vigna radiata 绿豆	1182	99	394	99
AY727902	YP 002608357	Vitis vinifera 葡萄	1182	98	394	97
NM126762	CAA47966	Arabidopsisthaliana 拟南芥	1182	96	394	95
BA000024	BAD66811	Beta vulgaris 甜菜	1182	96	394	94
AP006444	YP71717	Brassica napus 油菜	1182	96	394	93
BA000042	BAD83429	Nicotiana tabacum 烟草	1182	96	394	93

“—”GeneBank 数据库中尚未发表的 Cob 蛋白序列。

“—”Datas of cob amino acid sequence unpublised in GeneBank.



1: BamH I ; 2: Hind III

图3 cob基因的Southern blot分析

Fig.3 Southern blot analysis of cob gene

2.3 cob基因与其它植物基因的序列比较分析

将大豆JLGM-1B cob基因序列及其推导的氨基酸序列与GenBank数据库已发表的21种植物的cob基因核酸和氨基酸序列比较(表1),发现核苷酸序列相似性高达95%以上,与同为豆科的豌豆(AJ132231)、蚕豆(X07237)、绿豆(HM367685)核苷酸序列相似性高于98%;与同属于双子叶植物的番木瓜(EU431224)、香瓜(AY305265)、西葫芦(GQ856148)、甜菜(BA00024)、油菜(AP006444)等植物同源性均在96%以上;但与单子叶植物高粱(DQ984518)、水稻(BA000029)和玉米(AY506529)等植物的同源性低于95%。同Genebank上已发表

植物的氨基酸序列比对分析,栽培大豆 *cob* 氨基酸序列与其它植物的同源性均在 93% 以上。由此可以看出, *cob* 基因在物种间具有较高的保守性。

以 22 种植物同源核酸序列利用邻接法构建分子系统进化树(图 4)。图中可以看出栽培大豆与豆科植物豌豆(*Pisum sativum*)、蚕豆(*Vicia faba*)、绿豆(*Vigna radiata*)同源关系较近聚为一类;单子叶植物水稻(*Oryza sativa*)、玉米(*Zea mays*)、小麦(*Triticum aestivum*)、高粱(*Sorghum bicolor*)明显聚为一类;葫芦科的西瓜(*Citrullus lanatus*)、香瓜(*Cucumis melo*)、西葫芦(*Cucurbita pepo*)明显聚为一类;茄科的烟草(*Nicotiana tabacum*)、马铃薯(*Solanum tuberosum*)聚为一类。这与传统分类学进行的分类基本一致,说明该基因具有高度保守性可以作为物种亲缘关系或进化关系研究分析的潜在遗传标记。

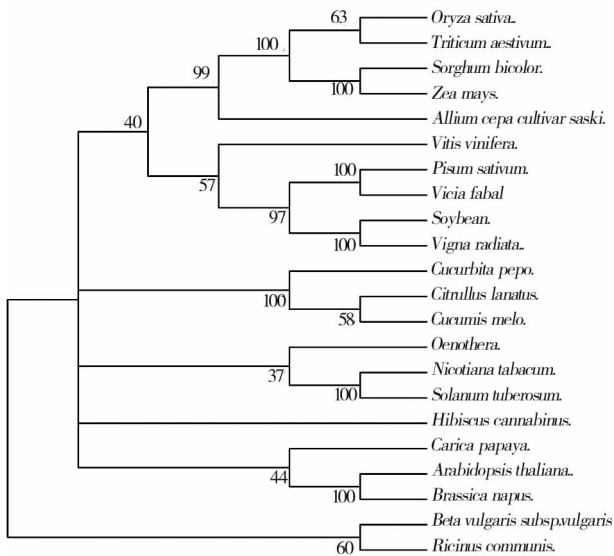


图 4 基于 *cob* 基因序列的 22 种植物的系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree of 22 plants based on nucleotide sequences of the *cob* gene

3 讨论

线粒体 DNA 系母系遗传,几乎没有异质性,进化速度快,是生物系统发育研究的理想标记。*cob* 基因是目前线粒体中结构和功能了解最为透彻的基因之一,进化速度适中,因而将其作为分子系统发育研究的分子标记,被广泛应用于解决不同分类阶段的系统发育分析^[2,6]。目前线粒体 *cob* 基因广泛应用于动物的系统发育、起源、分类分析上,如斑翅山鹑、家鹅的系统发育分析^[13-14],白鲑、石鲈科鱼类、石斑鱼、暗纹东方鲀及乌龟系统发育^[15-19],山羊、绵羊起源分类地位研究^[4,20],熊猫系统进化等^[21],罕见其应用在植物遗传演化分析中。

大豆起源问题一直是争论的焦点,世界公认栽培大豆起源于中国,但起源于中国何地却众说纷纭^[22]。对大豆的起源作出科学的判断,是一个具有相当难度的命题,虽然理论上可分析由野生性状到栽培性状的过渡类型,但实际上很难实现这种推断,因此需要从古农史的追溯、考古学研究、比较生物学等方面作综合分析。随着现代植物分类学的日益发展,各种新技术、新方法广泛应用于大豆的起源与进化研究中^[10]。周新安等^[23]利用形态性状遗传多样性分析对中国国家种质库保存的 22 595 份栽培大豆进行分析认为中国栽培大豆起源中心为由西南向东偏北方向延伸的带状区域。Shimamoto^[24]对栽培大豆叶绿体 DNA RFLP 和线粒体 DNA RFLP 的 3 种不同组合类型 cpII + mtIe、cpIII + mtVa、cpIII + mtVIIIc 的进化过程进行分析,认为这 3 种类型在野生和栽培大豆中演变是相互独立的过程,并推断其可能的演化过程。

该研究克隆栽培大豆(JLGM-1B) *cob* 基因并依据其核酸序列构建了分子系统进化树,结果表明大豆的分类地位与形态学所进行的分类地位基本一致,说明 *cob* 基因在遗传进化中较为稳定,可以作为物种亲缘关系或进化关系分析研究的潜在遗传标记。该研究为 *cob* 基因在植物系统发育分析和大豆近缘关系分析中的应用奠定了一定的基础,为大豆起源进化分析提供了一种潜在的分析方法。

参考文献

参考文献

- [1] 邵爱华,薛峰,陈葵,等. 暗纹东方鲀线粒体 ND1 及其侧翼 tRNA 基因的克隆及序列分析[J]. 苏州科技学院学报,2007,24(4):61-66. (Shao A H, Xue F, Chen K, et al. Cloning and sequence Analysis of ND1 and its flanking tRNA genes of mitochondrial from *Takifugu fasciatus* [J]. Journal of University of Science and Technology of Suzhou, 2007, 24(4): 61-66.)
- [2] Biswas S K, Wang L, Yokoyama K, et al. Molecular phylogenetics of the genus *trichosporon* inferred from mitochondrial cytochrome b gene sequences [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2005, 43(10): 5171-5178.
- [3] 齐兴柱,尹绍武,娄甜甜,等. 海南产花鳗鲡细胞色素 b 基因的克隆及序列分析[J]. 海南大学学报,2007,25(4):397-401. (Qi X Z, Yin S W, Lou T T, et al. Cloning and sequence analyses of cytochrome b gene of *Anguilla marmorata* from Hainan [J]. Natural Science Journal of Hainan University, 2007, 25(4): 397-401.)
- [4] 耿荣庆. 山羊线粒体 DNA 细胞色素 b 基因序列分析[J]. 草食家畜,2006,131(2):32-34. (Geng R Q. Sequence analysis of mitochondrial DNA cytochrome b gene from goat [J]. Grass-Feeding Livestock, 2006, 131(2): 32-34.)
- [5] Biswas S K, Yokoyama K, Wang L, et al. Typing of *candida albicans* isolates by sequence analysis of the cytochrome b gene and differentiation from *candida stellatoidea* [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2001, 39(4): 1600-1603.

- [6] Wang L, Yokoyama K, Miyaji M, et al. Identification, classification, and phylogeny of the pathogenic species *exophiala jeanselmei* and related species by mitochondrial cytochrome b gene analysis[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2001, 39(12):4462-4467.
- [7] Biswas S K, Wang L, Yokoyama K, et al. Molecular analysis of *cryptococcus neoformans* mitochondrial cytochrome b gene sequences[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2003, 41(12):5572-5576.
- [8] Yokoyama K, Biswas S K, Miyaji M, et al. Identification and phylogenetic relationship of the most common pathogenic *candida* species inferred from mitochondrial cytochrome b gene sequences[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2000, 38(12):4503-4510.
- [9] Biswas S K, Yokoyama K, Nishimura K, et al. Molecular phylogenetics of the genus *rhodotorula* and related basidiomycetous yeasts inferred from the mitochondrial cytochrome b gene[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2001, 51:1191-1199.
- [10] 田清震, 盖钧镒. 大豆起源与进化研究进展[J]. 大豆科学, 2001, 20(1):54-59. (Tian Q Z, Gai J Y. A review on the research of soybean origination and evolution[J]. Soybean Science, 2001, 20(1):54-59.)
- [11] 曾秀存, 孙万仓, 孟亚雄, 等. 十字花科植物线粒体 DNA 的提取和纯化[J]. 西北植物学报, 2005, 25(6):1137-1142. (Zeng X C, Sun W C, Meng Y X, et al. Extraction and purification of mtDNA in crucifer[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2005, 25(6):1137-1142.)
- [12] 萨姆布鲁克, 拉塞尔. 分子克隆实验室指南(第三版)[M]. 北京: 科学出版社, 2002:487-499. (Sambrook J, Russell D W. Molecular cloning: A laboratory manual[M]. 3rd Edition. Beijing: Scientific Press, 2002:487-499.)
- [13] 文隲英, 张立勋, 刘适发. 以 mtDNA 细胞色素 b 基因探讨斑翅山鹑的分类地位[J]. 动物学研究, 2005, 26(1):69-75. (Wen L Y, Zhang L X, Liu S F. Phylogenetic relationship of *perdix dauuricae* inferred from mitochondrial cytochrome b gene[J]. Zoological Research, 2005, 26(1):69-75.)
- [14] 陈艳荣, 王继文. 家鹅细胞色素 b 基因序列及系统发育研究进展[J]. 畜禽业, 2005, 187(11):17-19. (Chen Y R, Wang J W. Study on cytochrome b evolution in domestic goose[J]. Libestock and Poultry, 2005, 187(11):17-19.)
- [15] 张俊丽, 高天翔, 韩志强, 等. 三种白鲢线粒体细胞色素 b 和 16S rRNA 基因片段序列分析[J]. 中国水产科学, 2007, 14(1):8-14. (Zhang J L, Gao T X, Han Z Q, et al. Sequence analysis of partial cytochrome b and 16S rRNA genes of three coregonus species[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14(1):8-14.)
- [16] 朱世华, 郑文娟, 邹记兴, 等. 五种石鲈科鱼类细胞色素 b 基因序列及分子系统分析[J]. 热带海洋学报, 2006, 25(4):42-45. (Zhu S H, Zheng W J, Zou J X, et al. Molecular phylogenetic analysis of five pomadasyidae fish based on mitochondrial cytochrome b sequences[J]. Journal of Tropical Oceanography, 2006, 25(4):42-45.)
- [17] 陈艺燕, 章群, 任岗, 等. 十种石斑鱼系统发育的线粒体细胞色素 b 基因序列分析[J]. 海洋科学, 2006, 30(6):12-15. (Chen Y Y, Zhang Q, Ren G, et al. Molecular phylogeny of 10 species of groupers (*Serranidae: Epinephelinae*) based on mitochondrial cytochrome b gene sequences[J]. Marine Science, 2006, 30(6):12-15.)
- [18] 邵爱华, 郑峰, 吴胜, 等. 暗纹东方鲀 mtDNA 的分离纯化及其细胞色素 b 基因的分子克隆[J]. 水产科学, 2005, 24(5):4-7. (Shao A H, Zheng F, Wu S, et al. Isolation and purification of mitochondrial DNA and cytochrome b gene cloning in obscure puffer[J]. Fisheries Science, 2005, 24(5):4-7.)
- [19] 何中央, 张海琪, 徐晓林, 等. 乌龟线粒体细胞色素 b 基因片段的初步研究[J]. 宁波大学学报(理工版), 2005, 18(4):467-470. (He Z Y, Zhang H Q, Xu X L, et al. Preliminary study on partial sequences of mitochondrial DNA cytochrome b gene of *Chinemys reevesii*[J]. Journal of Ningbo University(NSEE), 2005, 18(4):467-470.)
- [20] 曹丽荣, 王小明, 饶刚, 等. 从细胞色素 b 基因全序列分析岩羊和山羊、绵羊的系统发生关系[J]. 兽类学报, 2004, 24(2):109-113. (Cao L R, Wang X M, Rao G, et al. The Phylogenetic relationship among goat, sheep and bharal based on mitochondrial cytochrome b gene sequences[J]. Acta Theriologica Sinica, 2004, 24(2):109-113.)
- [21] 王慧娟, 张志敏, 刘中来, 等. 从细胞色素 b 基因序列差异分析神农架白熊的系统进化关系[J]. 遗传, 2006, 28(10):1237-1241. (Wang H J, Zhang Z M, Liu Z L, et al. A molecular phylogeny of Shennongjia white bear based on mitochondrial cytochrome b gene sequence[J]. Hereditas, 2006, 28(10):1237-1241.)
- [22] 郭文韬. 试论中国栽培大豆起源问题[J]. 自然科学史研究, 1996, 15(4):326-333. (Guo W T. Concerning the origin of soybean cultivation in China[J]. Studies in History of Natural Sciences, 1996, 15(4):326-333.)
- [23] 周新安, 彭玉华, 王国勋, 等. 中国栽培大豆遗传多样性和起源中心初探[J]. 中国农业科学, 1998, 31(3):37-43. (Zhou X A, Peng Y H, Wang G X, et al. Preliminary studies on the centers of genetic diversity and origination of cultivated soybean in China[J]. Scientia Agricultura Sinica, 1998, 31(3):37-43.)
- [24] Shimamoto Y. Polymorphism and phylogeny of soybean based on chloroplast and mitochondrial DNA analysis[J]. Japan Agricultural Research Quarterly, 2001, 35(2):79-84.