

基于 *COI* 基因序列变异探讨日本蟳遗传多样性

杨柯^{1,2}, 马春艳¹, 马凌波^{1*}

(1. 中国水产科学研究院东海水产研究所, 上海 200090; 2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306)

摘要 [目的] 评估浙江省三门野生日本蟳遗传多样性, 为日本蟳的种质资源保护提供参考。[方法] 应用聚合酶链式反应(PCR)技术对采自三门的 30 个日本蟳个体的 mtDNA *COI* 基因进行扩增, PCR 产物经纯化、测序后获得的序列用软件进行比对分析。[结果] 获得长度为 547 bp 的 *COI* 基因一致序列, 其中变异位点 44 个, 总变异为 8.04%。在测得的 547 bp 目的 DNA 片段中, 碱基 T、C、A、G 平均组成分别为 35.7%、19.5%、28.5%、16.3%, 其 A+T 含量(64.2%) 远高于 G+C 含量(35.8%)。在 30 个个体中, 共检测到 7 个单倍型, 单倍型多样性为 0.772 7。根据 Kimura 遗传距离的计算结果, 日本蟳个体间遗传距离为 0.000~0.045。[结论] 与其他甲壳类相比, 三门野生日本蟳的遗传多样性水平偏低, 应采取措施对其进行保护和合理利用。

关键词 日本蟳; 线粒体 DNA; 细胞色素氧化酶亚基 I; 遗传多样性

中图分类号 S917 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2009)25-11895-02

Genetic Diversity of mtDNA *COI* Gene Sequence in *Charybdis japonica*

YANG Ke et al (East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090)

Abstract [Objective] The study aimed to evaluate the genetic diversity of wild *Charybdis japonica* in Sanmen, Zhejiang Province and provide references for germplasm resources protection. [Method] Polymerase chain reaction (PCR) technique was used to amplify the cytochrome oxidase subunit I (*COI*) gene from 30 individuals of *Charybdis japonica* caught from Sanmen. After PCR products had been purified and sequenced, the obtained sequences were aligned and analysed by using softwares. [Results] 547 bp sequences of *COI* gene were obtained and 44 variable sites were detected with total variation of 8.04%. The average nucleotide composition of T, C, A, G were 35.7%, 19.5%, 28.5% and 16.3%, respectively and the content of A+T (64.2%) was higher than that of G+C (35.8%). From the 30 individuals 7 haplotypes were detected and the haplotype diversity (H) was 0.772 7. The genetic distances between haplotypes vary from 0.000 to 0.045 by Kimura method. [Conclusion] The genetic diversity of wild *Charybdis japonica* in Sanmen is low, compared with other crustaceans. And some measures should be taken to protect the species and make rational utilization.

Key words *Charybdis japonica*; MtDNA; *COI*; Genetic diversity

日本蟳 (*Charybdis japonica*) 是我国传统的大型海产食用蟹类, 隶属甲壳纲、十足目、梭子蟹科 (Portunidae) 蟳属 (*Charybdis*), 在我国俗称为海蟳、石蟹, 广泛分布于渤海、黄海、东海、南海沿岸岛礁区及浅海水域, 亚洲的日本、朝鲜、东南亚等地也有分布。目前对日本蟳的研究集中在发育生物学、组织化学分析以及资源调查等方面^[1-4], 国内关于日本蟳遗传学方面的研究报道较少, 其中高天翔等^[5]分析了日本蟳和底栖短浆蟹 12S rRNA 基因片段的序列差异, 为日本蟳资源的进一步开发利用提供了基础资料。

线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 是细胞核外遗传物质, 具有分子较小、呈母系遗传、进化速率快、缺少重组等特点, 被广泛应用于进化遗传学、分子生态学、种群遗传结构分析、遗传多样性、物种及品系鉴定等方面研究^[6-9]。笔者通过对日本蟳线粒体 DNA 上 *COI* 基因片段序列进行分析, 研究日本蟳的遗传多样性水平和进化特征, 以期能够为日本蟳资源的可持续利用和合理开发提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料 日本蟳样本于 2008 年 6 月采自浙江三门湾, 酒精保存备用。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取。 基因组 DNA 提取参照文献^[10]的方法进行。取日本蟳螯足肌肉 100 mg, 加 600 μ l 抽提缓冲液 (10

mmol/L Tris-HCl, pH 值 8.0; 100 mmol/L EDTA, pH 值 8.0), 剪刀剪碎组织, 加入 SDS 和蛋白酶 K (终浓度分别为 1% 和 200 μ g/ml), 55 $^{\circ}$ C 水浴消化至溶液透明。待冷却后, 分别加入等体积酚、酚:氯仿:异戊醇 (25:24:1)、氯仿各抽提 1 次。2 倍体积预冷的无水乙醇沉淀 DNA, 70% 乙醇洗涤, 自然干燥后溶于 TE 溶液 (10 mmol/L Tris-HCl, pH 值 8.0; 1 mmol/L EDTA, pH 值 8.0) 中, 4 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.2 线粒体 *COI* 基因片段扩增。 所用引物序列为: Mtd-10, 5'-TTGATTTTTTTCGCTA-3'; C/N2769, 5'-TTAAGTCCT-AGAAAA-3' (上海生工生物有限公司合成)。PCR 反应总体积为 25 μ l, 包括 2.0 mmol/L MgCl₂, 0.2 mmol/L dNTP, 引物各 0.2 μ mol/L, 1 U *Taq* plus DNA 聚合酶 (上海生工), 1 \times PCR buffer 以及 30 ng 基因组 DNA。反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min 后, 经过 30 个循环, 每个循环包括 94 $^{\circ}$ C 45 s、53 $^{\circ}$ C 1 min、72 $^{\circ}$ C 1 min, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。

PCR 产物用含 EB 的 1.5% 琼脂糖凝胶 (1 \times TAE 配制) 电泳检测, 复日 FR980 型凝胶成像系统拍照记录; 所用的分子量标准为 DL2000 (Takara 产品)。PCR 产物用 UNIQ-10 柱式纯化试剂盒 (上海生工) 纯化, 纯化产物在 ABI3130 型自动测序仪上测序。

1.2.3 数据处理。 利用 Clustal X (1.83)^[11] 对测序结果进行对位排列, 并结合人工校正, 确定单倍型。分析序列的碱基组成、变异位点, 群体内单倍型多样性 (Haplotype diversity, H), 同时基于 Kimura 双参数法计算单倍型间的遗传距离, 以上分析均在 MEGA3.1^[12]、DnaSP 4.0^[13] 软件上进行。

2 结果与分析

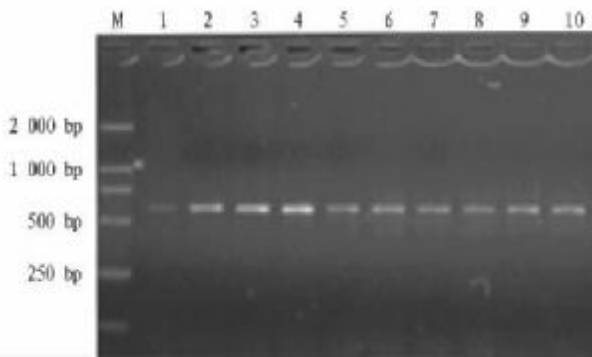
2.1 通过 *COI* 序列来评价日本蟳的遗传多样性 日本蟳 30 个个体的 *COI* 基因均能被清晰稳定地扩增, 产物经琼脂

基金项目 中央级公益性科研院所基本科研业务费重点项目 (2007Z01); 国家科技基础条件平台建设子项目课题 (2004DKA30470-004)。

作者简介 杨柯 (1982-), 男, 河南洛阳人, 硕士研究生, 研究方向: 水生生物学。* 通讯作者, 研究员, E-mail: malingbo@sina.com。

收稿日期 2009-02-10

糖凝胶电泳显示 1 条清晰明亮的条带,大小约 600 bp(图 1)。



注: 1~10. 日本蟳个体; M. DL2000.

Note: 1-10. Individual of *Charybdis japonica*; M. DL2000 molecular marker.

图 1 部分日本蟳线粒体 COI 基因片段扩增图谱

Fig. 1 Amplified products of mitochondrial COI gene of *Charybdis japonica*

```

[          111 1111222333 3333333444 4444455555 5555
[      1123579000 1179277045 6666778112 2455912233 3444
[      1290899124 2667938243 2589169095 8925383407 9124
#rx2  CTGCAATCGA CTATAGCCTC CAAGTTGTAC TAGACATCCT GACT
#rx7  .....
#rx8  .....
#rx9  .CCTG..TAT A.GG..T... TG...T&C. CC&..... A.TA
#rx12 ....GG...T ...G..TGC. .G.....&.. .CA..... A.TA
#rx18 ....G..TAT ...GCAT... TG..C..ACT .CATT..AC A.TA
#rx20 TC..G.C..T &C.....T T.GTCC.AC. .C..TT..A. A.T&

```

图 2 日本蟳部分线粒体 COI 序列变异位点

Fig. 2 Variable sites of mitochondrial COI gene segment sequences in *Charybdis japonica*

日本蟳作为东海区一种重要的中型可食用蟹类,自 20 世纪 80 年代以来,被大量的开发利用,特别是 90 年代以后广泛推广的蟹笼作业,不分季节,大大小小的日本蟳统统被捕捞上来销售,大大降低了日本蟳的经济价值,也不利于日本蟳资源的可持续开发利用,近来已呈现资源量下降的趋势^[14-15]。物种的遗传多样性越丰富,其适应能力、生存能力和进化潜力就越大,或者说遗传多样性为物种的适应能力、生存能力和进化潜力提供了潜在的遗传基础和储备。反之,遗传多样性的降低可导致其适应能力、生存能力降低,物种退化,极端情况下甚至威胁物种生存^[16]。与利用 COI 基因对其他甲壳动物的分析结果相比,日本蟳的单倍型多样性比日本沼虾 (*Macrobrachium nipponense*) 群体平均单倍型多态性 (0.919)^[17]、澳洲沼虾 (*Macrobrachium australiense*) 平均单倍型多态性 (0.923)^[18] 以及斑节对虾 (*Penaeus monodon*) 的单倍型多态性指数 (0.864)^[19] 都低。因此,从资源利用和保护上来讲,应采取适当措施进行禁渔期管理,保护其幼体和产卵群体,以便可持续利用日本蟳资源,避免其资源衰竭。

参考文献

[1] 蒋霞敏,王春琳. 食物条件对日本蟳幼体存活与变态的影响[J]. 应用生态学报,2004,15(1):173-175.
 [2] 刘洪军,戴玉蓉,张富君,等. 日本蟳人工育苗及养殖技术研究[J]. 海

2.2 日本蟳 COI 基因片段序列、遗传多样性及遗传距离 测序结果经比对校正后,获得三群体 COI 基因一致序列片段长 547 bp,其中变异位点 44 个,总变异为 8.04%。在测得的 547 bp 的目的 DNA 片段中,核酸平均碱基组成为 T 35.7%,C 19.5%,A 28.5%,G 16.3%。其 A + T 含量 (64.2%) 远高于 G + C 含量 (35.8%)。

在所测定的 30 个样本中,共定义了 7 种单倍型 (haplotype),各单倍型的变异位点见图 2,单倍型多样性为 0.772 7。通过 Kimura 双参数法,计算 30 个个体间的遗传距离,结果表明:所有个体间的遗传距离在 0.000 ~ 0.045,平均遗传距离为 0.024,最大的个体间遗传距离为 0.045。

3 讨论

该研究中,日本蟳的 COI 序列 AT 含量达到 64.2%,与其他蟹类 AT 含量极其相近^[5]。在甲壳类动物的研究中发现,线粒体基因中 AT 含量明显高于 GC 含量,证明 AT 含量高是节肢动物共同的特点。

洋科学,2000,24(8):23-27.
 [3] 王春琳,陈建青,叶晓园,等. 日本蟳的营养成分组成分析[J]. 营养学报,2005,27(1):81-83.
 [4] 王春琳,蒋霞敏,陈惠群,等. 日本蟳繁殖生物学的初步研究II——雄性繁殖习性及胚胎发育[J]. 东海海洋,2000,18(1):43-49.
 [5] 高天翔,张秀梅,渡边精一,等. 日本蟳和底栖短浆蟹线粒体 DNA 12S rRNA 基因序列的初步研究[J]. 中国海洋大学学报,2004,34(1):43-47.
 [6] AVISE J C. Molecular markers, natural history and evolution [M]. New York: Chapman and Hall,1994.
 [7] BILLINGTON N, HEBERT P D N. Mitochondrial DNA diversity in fishes and its implications for introductions [J]. Can J Fish Aquat Sci, 1991,48: 80-94.
 [8] WOLSTENHOLME D R. Animal mitochondrial DNA: structure and evolution [M]//WOLSTENHOLME D R, JEON K W. International review of cytology/a survey of cell biology mitochondrial genomes. New York: Academic Press, 1992: 173-216.
 [9] GRAVES J E. Molecular insights into the population structures of cosmopolitan marine fishes [J]. J Hered, 1998, 89: 427-437.
 [10] SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANIATIS T. Molecular cloning: a laboratory manual [M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
 [11] THOMPSON J D, GIBSON T J, PLEWNIAK F. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequences alignment aided by quality analysis tools [J]. Nucleic Acids Res, 1997, 25: 4876-4882.
 [12] KUMAR S, TAMURA K, NEI M. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment [J]. Briefings Bioinformatics, 2004, 5: 150-163.

(下转第 11913 页)

增产, 2 点减产; 2005 ~ 2006 年平均单产 6 183.00 kg/hm², 较对照增产 4.70%, 7 点增产, 1 点减产。2 年平均单产 5 860.50 kg/hm², 比对照平均增产 2.50%, 15 点汇总, 12 点增产。2006 ~ 2007 年安徽省淮南片生产试验平均单产 6 695.10 kg/hm², 比对照增产 8.10%, 6 点汇总, 全部增产。

2007 ~ 2008 年参加上海市小麦品比试验, 平均单产 6 081.00 kg/hm², 较对照增产 15.60% (表 1)。

表 1 扬麦 19 历年产量试验结果

年份	试验类别	扬麦 19 kg/hm ²	对照 kg/hm ²	较对照 增产//%
2002	鉴定圃	6 087.0	5 617.5	8.35
2003	品比圃	6 075.0	5 775.0	5.20
2004	长江下游适应性试验	6 295.5	6 130.5	2.70
2005	安徽省区试	5 536.5	5 524.5	0.20
2006	安徽省区试	6 183.0	5 905.5	4.70
2007	安徽省生产试验	6 694.5	6 195.0	8.10
2008	上海市品比试验	6 081.0	4 585.5	15.60

5 抗逆性表现

(1) 接种诱发鉴定。2005 年中国农业科学院抗性鉴定结果: 高抗白粉病, 中抗赤霉病, 中感纹枯病, 中抗条锈病, 高感叶锈病。2006 年中国农业科学院抗性鉴定结果: 白粉病免疫, 中抗赤霉病和纹枯病, 中抗至中感条锈病, 感叶锈病 (表 2)。

表 2 扬麦 19 抗病性鉴定结果

年份	白粉病	赤霉病	纹枯病	条锈病	叶锈病
2005	HR	MR	MS	MR	HS
2006	免疫	MR	MR	MR-MS	S

注: 抗病性鉴定单位为中国农业科学院植保所。HR 为高抗; MR 为中抗; MS 为中感; HS 为高感; S 为感。

(2) 田间自然鉴定。安徽省区域试验田间自然发病鉴定结果: 高抗白粉病, 条锈病、赤霉病轻度发生, 纹枯病感染较重, 抗倒性强。

上海市品比试验田间自然鉴定结果: 高抗白粉病, 抗倒性较强, 赤霉病抗性偏弱。

(3) 分子标记抗性鉴定。采用马正强等^[7]开发的 *Pm4a* 基因 STS 标记 4G + 4I 检测, 电泳图谱显示扬麦 19 具有 *Pm4a* 特征带, 表明扬麦 19 携带 *Pm4a* 基因。

6 品质分析结果

2007 年安徽省区域试验 (混合样) 品质分析结果: 容重 794 g/L, 粗蛋白 (干基) 12.21%, 湿面筋 24.5%, 吸水率 52.6%, 稳定时间 3.1 min。品质指标基本符合弱筋专用小

麦品种标准。

2006 ~ 2008 年连续 3 年采用弱筋小麦标准化栽培技术栽培, 经农业部谷物质量检测中心 (哈尔滨)、国家小麦改良扬州分中心检测, 扬麦 19 主要品质指标达国标优质弱筋小麦标准 (表 3)。

表 3 扬麦 19 主要品质指标

年份	蛋白质 %	湿面筋 %	吸水率 %	形成时间 min	稳定时间 min	品质检测单位
2006	11.26	21.3	53.9	1.5	1.7	国家小麦改良扬州分中心
2007	9.44	20.7	56.5	1.4	1.4	国家小麦改良扬州分中心
2008	10.57	17.9	55.2	1.3	1.1	农业部谷物质量检测中心
GB/T17892-1999						≤11.50 ≤22.0 ≤2.5

7 栽培技术要点及适用范围

(1) 适期播种, 优化群体起点。扬麦 19 在长江下游麦区适期播种范围为 10 月 25 日至 11 月上旬。过早播种 (早于 10 月 20 日) 易发生冻害。适期早播麦田, 基本苗 240 万/hm² 左右为宜。缺肥、迟播田, 基本苗相应增加。

(2) 合理运筹肥料, 协调群体生长。作为优质弱筋小麦生产, 为确保其达到优质饼干、糕点的品质标准, 降低籽粒蛋白质及面筋含量, 应适当降低氮肥的用量并降低后期施肥比例, 一般施纯 N 180 ~ 210 kg/hm², 肥料运筹为基肥: 平衡肥: 拔节孕穗肥 7:1:2, 基肥应有有机肥与无机肥结合。根据测土配方结果配合施用磷、钾肥。

(3) 防治病、虫、草害。适时搞好化除, 以控制杂草滋生危害。根据病虫测报及时做好纹枯病、赤霉病及蚜虫等病虫害的防治工作。

(4) 适用范围。适宜长江下游弱筋小麦产区推广种植, 尤其在白粉病重发地区种植更能发挥其抗病增产作用。

参考文献

- [1] 金善宝. 中国小麦学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1996.
- [2] 董进英. 小麦白粉病抗性基因的研究与利用 [J]. 种子, 1993 (2): 33 - 35.
- [3] 程顺和, 高德荣, 张伯桥, 等. 小麦抗白粉病的遗传改良及多系品系的配制 [J]. 麦类作物学报, 2003, 23 (2): 34 - 38.
- [4] 盛宝钦. 对我国小麦抗白粉病育种的初步设想 [J]. 小麦育种通讯, 1990 (2): 57 - 79.
- [5] 姚技强. 小麦白粉病各类抗源材料的评价及应用 [J]. 作物品种资源, 1995 (2): 57 - 59.
- [6] 张海泉, 符晓棠, 郝晨阳, 等. 小麦白粉病抗性基因的研究进展 [J]. 沈阳农业大学学报, 2003, 34 (1): 68 - 71.
- [7] MA Z Q, WEI J B, CHENG S H. PCR-Based markers for the powdery mildew resistance gene *Pm4a* in wheat [J]. Theor Appl Genet, 2004, 109: 140 - 145.

(上接第 11896 页)

- [2] 周鹏, 谢明勇, 傅博强. 多糖的结构研究 [J]. 南昌大学学报: 理科版, 2001, 25 (2): 197 - 203.
- [3] 周永. 多糖抗肿瘤作用的研究 [J]. 国外医学卫生分册, 2001, 28 (3): 129 - 131.
- [4] 李海平, 张树海, 张坤生. 滑菇多糖抗氧化活性研究 [J]. 食品研究与开发, 2008, 29 (4): 56 - 60.
- [5] 臧玉红, 牛桂玲, 李丽娟, 等. 滑子菇水溶性多糖提取工艺的研究 [J]. 食品科技, 2006 (11): 115 - 118.
- [6] 李海平, 王硕. 滑菇多糖制备的研究 [J]. 食品科学, 2005, 26 (1): 161 -

- 164.
- [7] 李德海, 孙常燕, 孙莉洁, 等. 微波辅助法提取滑菇多糖的工艺研究 [J]. 食品工业科技, 2008, 29 (4): 226 - 228.
- [8] 王萍, 李德海, 孙莉洁, 等. 超声波辅助法提取滑菇多糖的工艺研究 [J]. 中国食品学报, 2008, 8 (2): 84 - 88.
- [9] 王德杰, 李娟, 巨艳红, 等. 知母多糖的体外抗氧化作用研究 [J]. 现代中药研究与实践, 2008, 22 (2): 31 - 32.
- [10] 刘晓丽, 霍展祥, 张金莲. 盐酸川芎嗪体外抗氧化作用的研究 [J]. 中国航天医药杂志, 2003, 5 (2): 37 - 39.
- [11] 龚国清, 刘同征, 李立文. 西红花酸的体外抗氧化作用的研究 [J]. 中国药科大学学报, 2001, 32 (4): 306 - 309.