中华绒螯蟹遗传变异的 RAPD 分析^{*}

高志千 周开亚

(南京师范大学生物多样性与分子进化研究室, 南京 210097)

摘 要 用 31 个可重复性好的随机引物对中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 的辽河、瓯江和长江种群进行了 RAPD 分析。121 个扩增片段中有 27 个多态片段。遗传距离指数 (D) 表明中华绒螯蟹种内遗传变异较低 ($D = 0.004 \sim 0.063$)。3 个种群中, 辽河种群 ($D = 0.018$) 和瓯江种群 ($D = 0.025$) 遗传变异较高, 而长江种群遗传变异较低 ($D = 0.013$); 辽河种群和瓯江种群间遗传距离 ($D = 0.023$) 小于它们与长江种群间的遗传距离 (D 值分别为 0.028 和 0.032)。提示人类经济活动可能已使这 2 个种群发生了基因交流。

关键词 中华绒螯蟹, 遗传变异, RAPD

Genetic variation of the Chinese mitten handed crab (*Eriocheir sinensis*) populations detected by RAPD analysis/ GAO Zhi Qian, ZHOU Kai Ya

Abstract RAPD was employed to assess the genetic variation among *Eriocheir sinensis* populations of the Yangtze, Liaohe and Oujiang river systems. 31 random reproducible primers revealed 121 amplified fragments in which 27 were polymorphic. Intraspecific genetic variation was low ($D = 0.004 \sim 0.063$). Intrapopulation genetic variation of Liaohe population and Oujiang population were higher than that of Yangtze population while the interpopulation variation between Liaohe and Oujiang populations was lower than that between either of them and Yangtze population. The results suggest that the human economic activities have probably caused gene exchanges between the two populations.

Key words *Eriocheir sinensis*, genetic variation, RAPD

Author's address Biodiversity and Molecular Evolution Laboratory, Nanjing Normal University, Nanjing 210097

中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 是我国特有的名贵水产品, 70 年代末人工繁殖成功, 近年来已发展成为我国主要的养殖蟹类。我国天然蟹苗资源的主要产区为长江口、辽河口、海河口、钱塘江口、瓯江口以及闽江口, 其中长江水系河蟹品质最佳, 其生长快、个体大、肉味美, 深受消费者青睐。然而由于过捕、环境污染、兴修水利等原因, 目前长江水系蟹苗自然资源已近枯竭。养殖中不同水系河蟹种源的混杂^[1], 不仅给生产造成严重损失, 而且对中华绒螯蟹种质资源的保护亦十分不利。

近年来有关中华绒螯蟹同工酶水平遗传变异研究已有报道^[2~5]。本文用 RAPD 方法分析了其辽河、长江和瓯江种群的遗传变异, 以期对中华绒螯蟹种质资源的保护提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

中华绒螯蟹辽河种群成体采自辽宁省盘锦市两个养殖场(各 2 个), 长江种群成体(2 个)采自江苏省高淳县固城湖, 瓯江种群成体采自浙江省乐清养殖场(2 个)。

收稿日期: 1997 - 09 - 09; 接受日期: 1998 - 02 - 04

^{*} 江苏省应用基础研究和江苏省水产局资助项目 (BJ95109)

)和宁城养殖场(4) ,均系当地天然蟹苗人工养殖。所有样品 - 20 保存。

1.2 基因组 DNA 提取

取 0.2 ~ 0.5 g 附肢肌肉 ,提取基因组 DNA^[6] ,70 %乙醇沉淀 ,将 DNA 溶于适量 TE(pH 7.6) ,用 9023 型 DNA 微量荧光仪测定 DNA 浓度 ,4 存放。

1.3 PCR 反应体系

反应总体积为 40 μL [10 mmol/L Tris·HCl(pH 8.3) ,50 mmol/L KCl ,2 mmol/L MgCl₂ ,明胶 0.01 % ,100 mmol/L 每种 dNTP ,随机引物 15 ng ,50 ng 模板 DNA ,1 单位 Taq 酶 (Promega)] ,2 滴石蜡油覆盖。反应在 1109 DNA 扩增仪上进行。反应程序如下 :94 变性 60 s ,36 退火 60 s ,72 延伸 120 s ,42 个循环 ,最后 72 延伸 420 s。扩增产物 1.5 %琼脂糖凝胶电泳 ,EB 染色 ,紫外透射仪观察并照相。

1.4 引物筛选

200 个随机引物 2 次重复扩增结果稳定的有 72 个 ,随机选取 40 个引物把模板 DNA、镁离子或引物浓度分别上下改变 25 %^[7] ,用 31 个可重复性好的引物对全部样品进行 RAPD 分析。

1.5 统计分析

某一扩增片段的有无分别用‘ 1 ’和‘ 0 ’记录 ,得到‘ 1 * 0 ’数据矩阵。用 SPSS 软件包中的组内平均连锁法 (Within Group Average Linkage)和 Ward 的方法 (Ward ’s Method)对数据进行聚类分析。遗传距离指数 (D) 根据 Nei 相似性指数^[8]计算 :

$$D = 1 - S ,$$
$$S = 2 N_{xy} / (N_x + N_y)$$

其中 S 为任意两样品间相似性指数 ,N_{xy} 为样品 x 和 y 的共有片段总数 ,N_x 和 N_y 分别为样品 x 和 y 的 RAPD 片段总数。种群内遗传距离指数以所有样品间的 D 值平均数计算 ,种群间的遗传距离指数以两种群所有样品间的 D 值平均数计算。采用非加权组平均 (UPGMA)法和邻结法 (NJ)^[9]对种群间遗传距离数据聚类 ,重建 3 个种群的系统树。

2 结果

2.1 DNA 扩增结果

可重复的扩增片段共有 121 个 ,其中有 27 个存在多态。有 2 个引物扩增到长江种群特异的 RAPD 图谱 (另文发表)。图 1 是引物 OPF-10(A)和 OPO-7(B)的扩增产物电泳图谱。

2.2 遗传变异和聚类分析

由 121 个片段的分析表明 ,中华绒螯蟹遗传变异较小 ,D 值在 0.004 ~ 0.063 之间 ,平均 0.024。种群内、种群间的遗传距离指数见表 1。3 个种群中 ,长江种群遗传变异较小 (D = 0.13)。瓯江种群遗传变异较大 ,两个采样点 D 值无显著差异 ,平均 0.025。辽河种群两个

表 1 中华绒螯蟹种群内、种群间的遗传距离指数 (D)

Table 1 Genetic distance index (D) within and between populations of <i>Eriocheir sinensis</i>					
	YQ	NC	PJ1	PJ2	YT
YQ	0.023				
NC	0.025	0.027			
PJ1	0.026	0.024	0.023		
PJ2	0.023	0.021	0.018	0.013	
YT	0.031	0.032	0.032	0.024	0.013

注:表中 YQ , NC 分别为乐清、宁城的瓯江种群 ;PJ1 , PJ2 为辽河种群 ;YT 为长江种群
YQ , NC : Oujiang population from Yueqing and Ningcheng respectively. PJ1 , PJ2 : Liaohe population. YT : Yangtze population

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 M

A

M CN 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20

B

图 1 中华绒螯蟹基因组 DNA 随机扩增产物电泳图谱 :A. 引物 OPF-10. B. 引物 OPO-7. 1~4, 5~8 分别为采自乐清和宁城的瓯江种群;9~16, 17~20 分别为辽河种群和长江种群;CN 为空白对照;M 为 DNA *EcoRI*/ *Hind* 分子量标记

Fig. 1 Electrophoresis patterns of RAPD products generated from the genomic DNA of *Eriocheir sinensis*. A. Primer OPF-10. B. Primer OPO-7. Lanes 1~4, 5~8: Oujiang population collected in Yueqing and Ningcheng, . CN: Negative control. M: DNA *EcoRI*/ *Hind* size marker

采样点 D 值差异虽较大,但两群体间 D 值很小,两者合并后 D 值为 0.018,遗传变异介于长江种群和瓯江种群之间。辽河种群和瓯江种群间遗传距离 ($D = 0.023$) 小于它们与长江种群间的遗传距离 (分别为 $D = 0.028$ 和 0.032)。

组内平均连锁法和 Ward 法聚类结果均显示,长江种群样品组成一个独立的分支,而瓯江种群和辽河种群样品组成另一分支(图 2)。其它的聚类方法所得结果与此存在差别,个别瓯江种群的个体位于树的基部。在这些聚类方法中,组内平均连锁法和 Ward 法的聚类结果分别使组内平均距离和距离平方和最小,因此对于遗传背景尚不了解的 RAPD 数据,这两种方法的聚类结果较为可靠。

在各种群间的 UPGMA 树和 NJ 树中(图 3),瓯江种群和辽河种群也先聚在一起,然后再与长江种群聚类,但瓯江种群和辽河种群位置有所不同。在 UPGMA 树(图 3A)中,瓯江种群

图 2 中华绒螯蟹随机扩增片段的组内平均连锁法聚类图(数字见图 1)

Fig. 2 Dendrogram of *Eriocheir sinensis* derived from RAPD fragments by Within Group Average Linkage cluster analysis. Numbers refer to fig. 1

图 3 根据遗传距离(表 1)得到的中华绒螯蟹种群间聚类图: A. UPGMA 树, B. NJ 树(缩写见表 1)
Fig. 3 Dendrograms of the populations of *Eriocheir sinensis* based on the genetic distance matrix in table 1 with UPGMA (A) and NJ (B) method. Abbreviatons refer to Table 1

与长江种群关系较近,而在 NJ 树(图 3B)中,辽河种群与长江种群关系较近。

3 讨论

绒螯蟹属的亚种分化已有报道,分布于雷州半岛以西的绒螯蟹为日本绒螯蟹合浦亚种^[10]。而 Guo 等认为雷州半岛以西和以东的绒螯蟹相同,应为独立的物种,即合浦绒螯蟹(*E. hepuensis*)^[11]。中华绒螯蟹分布于我国 N 24 °以北至朝鲜西岸沿海水域^[12],其生活史大部分时期是在淡水中,只有繁殖期和发育早期(大眼幼体期以前)在河口半咸水中,因而种群扩散有一定局限性。从形态学上尚未确定是否构成地理亚种^[10]。但同工酶研究提示长江水系中华绒螯蟹个体分别与辽河水系个体存在 EST 同工酶^[2],与瓯江水系个体存在 MDH 同工酶^[3]差异。这提示中华绒螯蟹存在种群遗传分化。RAPD 分析表明中华绒螯蟹种内遗传变异较低($D = 0.024$),长江种群与其它 2 个种群差异较大,但尚不能确定是否达到了亚种级水平。

本文未发现辽河种群与瓯江种群间的显著差异,这可能是因为:1)所得到的多态片段不够多。但我们筛选了 200 个随机引物未发现区别这 2 个种群的特异片段,因而这种可能性较小;2)由于人类经济活动使这 2 个种群发生了基因交流。据作者 1996 年 9 月在辽宁省丹东、庄河、营口及盘锦等地调查,辽河水系中华绒螯蟹种群 70 年代末受工业污染等影响急剧下降,目前辽河水系及丹东至大连沿岸水域已无具有利用价值的苗汛。近年来辽河地区河蟹养殖业发展迅速,相当一部分种源来自南方地区。由于河蟹养殖中河蟹逃逸现象较普遍,从而导致辽河地区的河蟹种源混杂。而在长江水系种群枯竭、苗种价格高昂的情况下,瓯江水系丰富的种群资源成为最可能的来源。谷孝鸿等也报道过北方地区到南方购买繁殖用亲蟹、培育的幼蟹又出售于南方^[13]。

长江水系中华绒螯蟹种群资源的保护已为水产界普遍关注。本文的研究显示长江种群的遗传变异在 3 个种群中最低($D = 0.013$)。但由于本研究长江种群样品较少,因此其遗传变异低是否与种群下降有关尚待进一步研究。另一方面,近年长江流域河蟹养殖中外来蟹苗的问题也十分严重,长江的天然蟹苗中是否已经出现带有辽河种群或瓯江种群基因的个体是亟待密切监测的问题。

致谢 江苏省水产局赵明森、江苏省高淳县水产局、辽宁省盘锦市水产局、浙江省乐清市水产局在标本采集中给予大力支持,南京师范大学生物系徐信荣、郝家胜帮助采集了标本,杨

光和王义权在研究工作中提出宝贵意见,特此致谢。

参 考 文 献

- 1 赵仁宣. 谈河蟹人工繁殖中的几个问题. 水产养殖, 1996, 6:30
- 2 王丹, 于伟君. 辽河长江两水系中华绒螯蟹酯酶和乳酸脱氢酶的同工酶比较研究. 辽宁大学学报(自然科学版), 1995, 22(4):79~81.
- 3 张洁, 陈立桥, 周忠良等. 中华绒螯蟹同工酶发育遗传学研究 I. 长江中华绒螯蟹不同组织同工酶的特异性分析. 华东师范大学学报(自然科学版)动物学专集, 1996, 38~42
- 4 李广丽, 李思发. 长江、瓯江、辽河中华绒螯蟹消化酶的初步研究. 上海水产大学学报, 1996, 5(2):134~137
- 5 许加武, 李思发. 长江口中华绒螯蟹与其它几种同科蟹的同工酶比较. 水产科技情报, 1996, 23(4):159~162
- 6 Sambrood J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning, a laboratory manual (2nd edn.), New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, 464~467
- 7 Rieseberg L H, Gerber D. Hybridization in the Catalina Island Mountain Mahogany (*Cercocarpus traskiae*): RAPD evidence. *Conservation Biology*, 1995, 9(1):199~203
- 8 Nei M, Li W H. Mathematical model for studying genetic distance in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Aca. Sci. USA*, 1979, 76:5269~237
- 9 Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA: Molecular evolutionary genetics analysis, version 1.01. The Pennsylvania State University, University Park, PA 16802, 1993
- 10 戴爱云. 绒螯蟹属亚种分化的研究(十足目, 短尾派). 系统进化动物学重点实验室论文集(第一集), 北京: 中国科学技术出版社, 1991, 61~71
- 11 Guo J Y, Ng N K, Dai A, Ng P K L. The taxonomy of three commercially important species of mitten crabs of the genus *Eriocheir* De Haan, 1835. (Crustacea; Decapoda; Brachyura; Grapsidae). *The Raffles Bulletin of Zoology*, 1997, 45(2):445~476
- 12 戴爱云, 杨思谅, 宋玉枝, 陈国孝(编著). 中国海洋蟹类. 北京: 海洋出版社, 1986, 1~642
- 13 谷孝鸿, 胡文英. 略论河蟹养殖存在问题及对策. 海洋湖沼通报, 1996, 1:55~57