

中国大陆沿海六水系统绒螯蟹(中华绒螯蟹和日本绒螯蟹)群体亲缘关系: RAPD 指纹标记

李思发 邹曙明

(农业部水产增养殖生态、生理重点开放实验室, 上海水产大学, 200090)

摘 要 用 48 个具有丰富多态性的 10 碱基随机引物对辽河、黄河、长江、瓯江、珠江和南流江的中华绒螯蟹和日本绒螯蟹的 6 个群体进行 RAPD 分析。结果发现: (1) 两个引物具有群体特异性带, 其中 Z2 扩增的 880bp 片段为珠江蟹和南流江蟹群体中所特有, 而 700bp 片段为长江蟹、辽河蟹、黄河蟹和瓯江蟹所特有, 可作为区别日本绒螯蟹和中华绒螯蟹的分子遗传标记; (2) O_{pp17} 扩增的 947bp 片段的出现频率, 在长江、黄河和辽河群体显著地从南到北递减, 长江蟹 87.50%、黄河蟹 41.66%、辽河蟹 10.83%。这一遗传渐变的度量可作为区别这三个水系的中华绒螯蟹种群的判据; (3) 6 水系群体内的平均遗传相似度依次为: 辽河蟹 0.908 > 南流江蟹 0.897 > 瓯江蟹和珠江蟹 0.895 > 黄河蟹 0.890 > 长江蟹 0.850; 6 群体间遗传距离及其 UPGMA、NJ 聚类分析进一步表明, 南流江蟹、珠江蟹同长江蟹、辽河蟹及黄河蟹在基因组之间存在明显的歧化。

关键词 中华绒螯蟹, 日本绒螯蟹, 群体, 亲缘关系, 随机扩增多态 DNA 指纹标记

中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 属节肢动物门、甲壳纲、十足目、方蟹科、绒螯蟹属。对于绒螯蟹属内的分类, 目前比较流行的说法是把绒螯蟹属分为 4 个种 [Sakai 1976], 除中华绒螯蟹外, 尚有日本绒螯蟹 (*E. japonicus*)、狭颚绒螯蟹 (*E. leptoganthus*) 和直额绒螯蟹 (*E. rectus*)。其中, 以中华绒螯蟹经济价值最高, 是重要的增养殖对象; 日本绒螯蟹次之, 在华南地区有一定的养殖; 狭颚绒螯蟹和直额绒螯蟹无论在形态上、还是在生态及分布上都同中华绒螯蟹及日本绒螯蟹有较大区别, 而且个体太小, 无甚么经济价值。中华绒螯蟹和日本绒螯蟹俗称河蟹或毛蟹。中华绒螯蟹在我国北起鸭绿江, 南到福建闽江均有分布, 日本绒螯蟹在我国主要分布于珠江流域和广西南流江流域 [戴爱云 1991]。70 年代起全国开展中华绒螯蟹人工增养殖经济效益显著; 近年来, 广西南流江的日本绒螯蟹也开始开发养殖。河蟹养殖全国总产量 1998 年达 10 万吨。近十几年来, 由于河蟹养殖业的蓬勃发展和市场流通, 各个水系的绒螯蟹正在加速混杂。尽快查明各水系绒螯蟹之间的亲缘关系, 弄清它们之间的遗传差异, 不但对于澄清绒螯蟹的系统分类, 尤其对于绒螯蟹的种质资源的保护和开发利用是十分必要的。为此, 我们对辽河、黄河、长江、瓯江、珠江及广西南流江水域中华绒螯蟹和日本绒螯蟹的形态、生化遗传及分子遗传进行了综合研究。本文报道应用随机扩增多态 DNA (RAPD) 技术的研究结果。

1 材料和方法

1.1 材料

1998年9~12月,样本蟹分别采自辽河(辽宁盘锦)、黄河(山东东平)、长江(江苏镇江)、瓯江(浙江温州)、珠江(广东顺德)和南流江(广西合浦)的群体[以下简称辽河蟹、黄河蟹、长江蟹、瓯江蟹、珠江蟹、南流江蟹],闽江水系绒螯蟹天然资源贫乏,未能采到样本。除黄河蟹为人工繁殖群体后代外,其他都是天然群体。对每群体随机取样,各30个体,雌雄各半。平均体重分别为98.2g(辽河)、107.2g(黄河)、139.8g(长江)、75.0g(瓯江)、50.1g(珠江)和38.1g(南流江)。随机引物为经挑选的在绒螯蟹基因组中具有丰富多态性的10碱基引物,共48个,其中32个来自Operon公司,另16种为自行设计,并由Takara公司合成。先用这48个引物对6群体各4个体(2雌2雄)共24个体进行扩增,对结果进行统计分析,在此基础上找出具有种群特征带的引物,然后进行大样本分析,每群体分析30个体,雌雄各半。

1.2 实验方法

1.2.1 基因组DNA的提取与RAPD分析

取0.3g左右蟹腿肌肉,按金冬雁和黎孟枫[1996]的方法提取基因组DNA。PCR扩增按Williams等[1990]的方法进行。

1.2.2 群体内和群体间遗传相似度的计算

个体间遗传相似度根据Lynch[1990a]的公式计算,用SAS软件作方差分析。

1.2.3 遗传距离的计算

群体间遗传距离按Lynch[1990b]的公式计算: $D_{xy} = -\ln[F_{xy}/(F_x(F_y))^{1/2}]$ 其中: F_{xy} 为两个群体X和Y之间的平均遗传相似度, F_x 和 F_y 分别为群体X内和Y内的平均遗传相似度。

1.2.4 聚类分析

根据群体间的遗传距离,用MEGA软件包中的UPGMA[Sneath和Sokal 1973]和NJ[Satio和Nei 1987]程序对6个群体进行聚类分析。

2 结果

2.1 PCR扩增结果

用48个多态引物对6群体各4个体(2雌2雄)共24只个体进行PCR扩增,扩增结果稳定,重复性佳,扩增图谱具有丰富的引物特异性和模板特异性,未发现24个体中每种引物有2个谱带

完全相同的情况,表明河蟹基因组具有丰富的遗传变异度。48个引物共扩增出288条带,平均每个引物扩增出6条带。扩增带大小分布在0.23~2.30kb之间(图1,图2)。

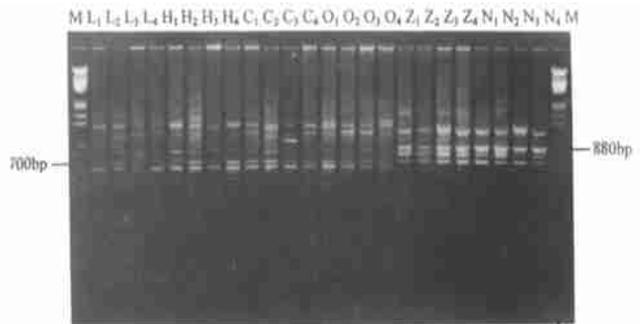


图1 引物Z2在绒螯蟹6群体(各4个体)中扩增的880bp和700bp片段

Fig. 1 The 880bp and 700bp band amplified by Primer Z2 in six populations of mitten crab (4 samples each)

L: 辽河蟹, H: 黄河蟹, C: 长江蟹, O: 瓯江蟹, Z: 珠江蟹, N: 南流江蟹, M: λ /EcoRI+HindIII

2.2 RAPD 分子标记

用 48 个多态引物对 6 群体各 4 个体(2 雌 2 雄)共 24 只个体进行扩增,引物 Z2(CTTTCGCTCC)(图 1)和 Opp17(TGACCCGCCT)(图 2)在 6 群体中存在明显的种群特异性扩增带。

Z2 扩增的 880bp 片段仅在珠江蟹和南流江蟹存在,而在长江蟹、辽河蟹、黄河蟹和瓯江蟹不存在,对大样本(30 个体)进行的分析进一步确证了这一点;Z2 扩增的 700bp 片段在长江蟹、辽河蟹、黄河蟹和瓯江蟹存在,而在珠江蟹和南流江蟹不存在,对大样本(30 个体)的分析也进一步确证了这一点。以上结果表明,华南水系的绒螯蟹同华东、华北、东北水系的绒螯蟹在遗传上确有显著差异。

Opp17 扩增的 947bp 片段在 6 群体各 4 个体中的出现频率分别为:长江蟹 100%、南流江蟹 75%、珠江蟹 50%、瓯江蟹 50%、黄河蟹 25%、辽河蟹 0(图 3);而在大样本的分析结果是:长江蟹 87.50%、南流江蟹 78.26%、瓯江蟹 78.26%、珠江蟹 61.66%、黄河蟹 41.66%、辽河蟹 10.83%(图 4);该片段在绒螯蟹种群内的出现频率在长江及长江以南水系中较高,而在黄河及黄河以北水系较低,表现出从长江到黄河到辽河显著降低的遗传渐变现象。

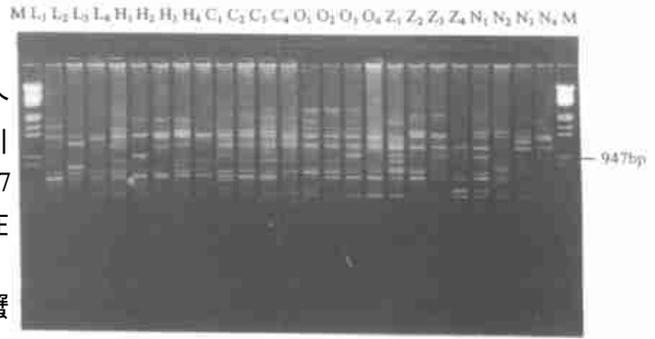


图 2 引物 Opp17 在 6 群体绒螯蟹(各 4 个体)中扩增的 947bp 片段

Fig.2 The 947bp band amplified by Primer Opp17 in six populations of mitten crab(4 samples each)

L: 辽河蟹, H: 黄河蟹, C: 长江蟹, O: 瓯江蟹,
Z: 珠江蟹, N: 南流江蟹, M: λ / EcoRI+ HinIII

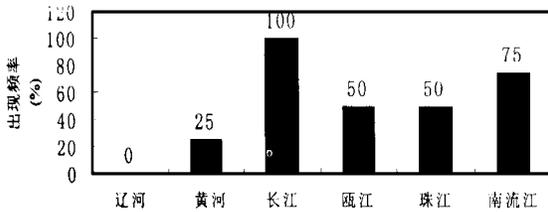


图 3 Opp17 扩增的 947bp 片段在 6 水系绒螯蟹群体(各 4 个体)中的出现频率

Fig.3 Distributed frequency of 947bp band amplified by Primer Opp17 in six populations of mitten crab(4 samples each)

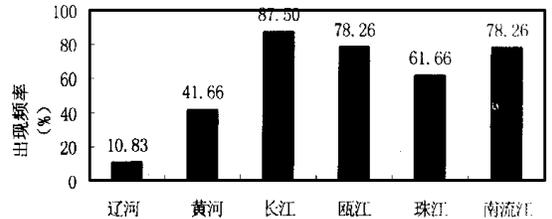


图 4 Opp17 扩增的 947bp 片段在 6 水系绒螯蟹群体(各 30 个体)中的出现频率

Fig.4 Distributed frequency of 947bp band amplified by Primer Opp17 in six populations of mitten crab(30 samples each)

2.3 遗传相似度和遗传距离

2.3.1 群体内

6 水系绒螯蟹群体内的遗传相似度如表 1。其大小依次为:辽河蟹 0.908> 南流江蟹 0.897> 瓯江蟹 0.895= 珠江蟹 0.895> 黄河蟹 0.890> 长江蟹 0.850。用 SAS 软件方差分析结果表明,辽河蟹同其它水系绒螯蟹之间存在显著差异($P < 0.05$);长江蟹同其它水系绒螯蟹之间存在显著差异($P < 0.05$)。

2.3.2 群体间

6 水系绒螯蟹群体相互间的遗传相似度和遗传距离如表 2。遗传相似度总平均值为 0.778。南流江蟹与辽河蟹之间的遗传距离最大(0.203), 它们同其他水系蟹的遗传距离由北向南逐渐减小, 表明绒螯蟹的基因组从南到北存在明显的歧化; 在这一歧化中, 南方(南流江蟹和珠江蟹)同北方(长江蟹、辽河蟹及黄河蟹)的遗传距离的平均值高达 0.170, 而北方 3 水系蟹的遗传距离平均值低达 0.082。

表 1 6 水系绒螯蟹各群体内的遗传相似度

Tab.1 Genetic similarities within each population of mitten crabs in 6 river systems

	辽河	黄河	长江	瓯江	珠江	南流江
1~ 2	0.912	0.890	0.847	0.893	0.895	0.896
1~ 3	0.905	0.882	0.852	0.893	0.896	0.900
1~ 4	0.896	0.890	0.848	0.892	0.893	0.888
2~ 3	0.904	0.888	0.858	0.900	0.894	0.894
2~ 4	0.911	0.892	0.842	0.897	0.902	0.898
3~ 4	0.920	0.898	0.853	0.895	0.890	0.906
均值 A	0.908	0.890	0.850	0.895	0.895	0.897

注: 1~ 2 表示个体 1 与个体 2 之间, 其它类似。

2.3.4 聚类分析

根据表 2 数值, 用 MEGA 软件包中的 UPGMA 及 NJ 软件进行聚类分析, 结果(图 5)一致表明, 珠江蟹与南流江蟹首先聚在一起, 表明这两个群体的亲缘关系较近; 而辽河蟹则与黄河蟹及长江蟹聚在一起, 表明这三个群体的亲缘关系较近。略有出入的是, 从 UPGMA 树来看(图 5B), 黄河蟹与长江蟹的亲缘关系较近; 而从 NJ 树来看(图 5A), 黄河蟹与辽河蟹亲缘关系较近, 不过, 这都不影响它们同属于北方水系蟹的判别。

3 讨论

3.1 中华绒螯蟹和日本绒螯蟹关系的新佐证和新认识

在分类上, 绒螯蟹属各种、亚种及地理群体的分类一直存在很大意见分歧。对其中中华绒螯蟹和日本绒螯蟹的分类也有许多争议。Chan 等[1995]重新对 Stimpson 于 1858 年从澳门采集的绒螯蟹标本进行分析后, 认为 Stimpson 当时命名为直额绒螯蟹所用的标本实际上是日本绒螯蟹的幼蟹, 因此认为直额绒螯蟹是日本绒螯蟹的同物异名。戴爱云[1991]根据形态学指标把广西合浦地区南流江的绒螯蟹定名为日本绒螯蟹合浦亚种; 而 Guo 等[1997]则进一步把南流江地区的绒螯蟹提升为新种—南流江绒螯蟹, 并把狭额绒螯蟹和台湾绒螯蟹从绒螯蟹属中分出归入其它属, 认为绒螯蟹属只有日本绒螯蟹、中华绒螯蟹和南流江绒螯蟹 3 个种。但是, 堵南山[1998]认为被戴爱云与 Guo 先后定为

表 2 6 水系绒螯蟹群体间的遗传相似度和遗传距离

Tab.2 Genetic similarities between populations of mitten crabs in 6 river systems

	辽河	黄河	长江	瓯江	珠江	南流江
辽河		0.820	0.795	0.760	0.748	0.737
黄河	0.092		0.823	0.780	0.760	0.755
长江	0.100	0.055		0.793	0.755	0.745
瓯江	0.171	0.135	0.095		0.780	0.800
珠江	0.187	0.161	0.144	0.138		0.825
南流江	0.203	0.168	0.158	0.113	0.083	

注: 对角线左下方为遗传相似度, 对角线右上方为遗传距离。

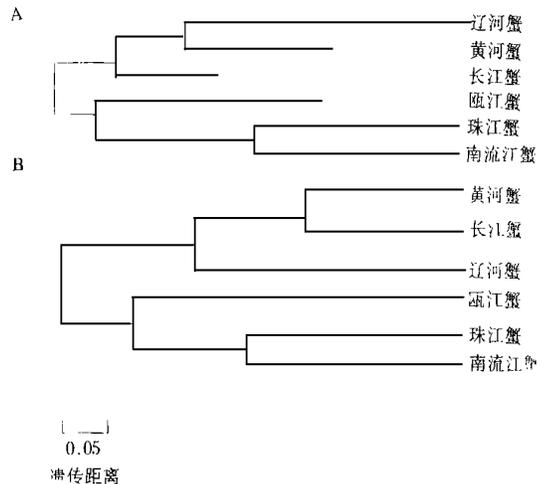


图 5 6 水系绒螯蟹群体间聚类关系

Fig.5 Dendrograms of populations of mitten crabs in 6 river systems based on UPGMA(A) and NJ(B) method

A: NJ 树, B: UPGMA 树

亚种和种的南流江地区绒螯蟹很可能是日本绒螯蟹在南方地区的一个种群。

90 年代初以来,对绒螯蟹亲缘关系的研究引入了同工酶技术,Zhang 和 Lu[1992]对成熟的中华绒螯蟹及日本绒螯蟹合浦亚种进行同工酶研究,没有发现两者之间有何明显差异。Li 等[1993]用同工酶方法比较了取自广东的三个群体(澳头、阳田及莲花山)和上海昆山的绒螯蟹,发现四个群体间的生化遗传差异极微,遗传距离在 0~0.03 之间,认为它们为同一个种,中华绒螯蟹和日本绒螯蟹是同物异名。

综观国内外近年来的报道,根据形态特征的研究结果有把绒螯蟹属各种或种群在分类学上提升的倾向,而同工酶的研究结果则有在分类学上降级的倾向。

90 年代末,项超美等[1998]用 RAPD 方法分析包括长江流域中华绒螯蟹和日本绒螯蟹合浦亚种在内的 4 种十足目甲壳动物,发现日本绒螯蟹合浦亚种与中华绒螯蟹存在一些群体特异性扩增带。最近,谢浩等[1999]用引物 Opo-05 对来自湖北武汉的中华绒螯蟹、广东澳头的日本绒螯蟹及广西合浦的日本绒螯蟹合浦亚种进行个体扩增,发现前者能扩增出一条 1kb 左右的条带;而在后者,该条带见于少数个体。

本研究同时调查中国大陆沿海从南到北 6 个水系的绒螯蟹,发现 Z2 扩增的 880bp 片段为珠江蟹和南流江蟹所特有,700bp 片段则为长江蟹、辽河蟹、黄河蟹和瓯江蟹所特有,南北两大区域的绒螯蟹存在截然不同的分子标记;而 6 群体间的遗传距离分析则进一步表明南流江蟹和珠江蟹这 2 个南方水系群体同长江蟹、辽河蟹及黄河蟹等北方水系群体的歧化明显。依据以上两点,可认为中国大陆南北地域的绒螯蟹应属两类,一类是分布于华南地区珠江和南流江的绒螯蟹,为日本绒螯蟹;另一类是分布于华东、华北及东北地区的绒螯蟹,为中华绒螯蟹。本室同时进行的生化遗传研究[赵金良和李思发 1999]和形态特征多元分析[李晨虹和李思发 1999]结果也有力地支持这一认识。至于瓯江蟹,虽然遗传距离及 NJ、UPGMA 分析结果显示其与珠江蟹、南流江蟹的亲缘关系较近,但 Z2 扩增结果显示其与长江蟹、辽河蟹及黄河蟹有相同的遗传标志,结合形态分析和同工酶分析结果,瓯江蟹仍应属于中华绒螯蟹。

3.2 中华绒螯蟹不同水系间的遗传差异

本研究同邱涛等[1997]、高志千和周开亚[1998]RAPD 研究结果相似之处是,均未发现长江、辽河、瓯江三水系中华绒螯蟹的群体的分子遗传标记,但本研究结果揭示,在中华绒螯蟹分布区域内,存在明显的遗传渐变现象,主要表现在 O_{pp}17 扩增的 947bp 片段在种群内的出现频率从南到北显著递减,这一遗传渐变的度量可用作区别长江、黄河及辽河中华绒螯蟹群体的判据。

赵金良、李晨虹、李家乐同志参与采集样本工作,张敏同志帮助冲洗照片,特此致谢。

参 考 文 献

- 李晨虹,李思发. 1999. 中国大陆沿海六水系绒螯蟹(中华绒螯蟹和日本绒螯蟹)群体亲缘关系的形态判别分析. 水产学报, 23(4): 337~342
- 邱涛,陆仁后,项超美等. 1997. RAPD 方法对中华绒螯蟹长江、辽河、瓯江群体的遗传多样性分析. 淡水渔业, 27(5): 1~4
- 金冬雁,黎孟枫(译). 1996. 分子克隆实验指南(第二版). 北京: 科学出版社. 464~467
- 赵金良,李思发. 1999. 中国大陆沿海六水系绒螯蟹(中华绒螯蟹和日本绒螯蟹)群体亲缘关系的生化遗传差异分析. 水产学报, 23(4): 331~336

- 项超美, 陆仁后, 谢 浩等. 1998. 四种十足目甲壳动物遗传差异的 RAPD 分析. 水生生物学报, 22(3): 251~ 256
- 高志千, 周开亚. 1998. 中华绒螯蟹遗传变异的 RAPD 分析. 生物多样性, 6(3): 186~ 190
- 堵南山. 1998. 中华绒螯蟹的同属种类及其英文名称. 水产科技情报, 25(3): 108~ 109
- 谢 浩, 陆仁后, 项超美等. 1999. 利用 RAPD 技术对三种绒螯蟹亲缘关系的研究. 水生生物学报, 23(2): 120~ 125
- 戴爱云. 1991. 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. 61~ 71
- Chan T Y, Hung M S, Yu H P. 1995. Identity of *Eriocheir rectus* (Stimpson, 1858) (Decapoda: Brachyura), With description of a new mitten crab from taiwan. J Crustacean Biol, 15(2): 301~ 308
- Guo J K, Ng N K, Dai A, et al. 1997. The taxonomy of three commercially important species of mitten crabs of the genus *Eriocheir* de Haan, 1835(Crustacea: Decapoda: Brachyura: Grapsidae). Raffles Bull Zool. 45(2): 445~ 476
- Li G, Shen Q, Zhen X X. 1993. Morphometric and biochemical genetic variation of the mitten crab, *Eriocheir*, in southern China. Aquac, 111:103~ 115
- Lynch M. 1990a. The similarity index and DNA fingerprinting. Mol Biol Evol. 7: 478~ 484
- Lynch M. 1990b. Analysis of population genetic structure by DNA fingerprinting. In: DNA fingerprinting approaches and applications. Burket, et al. Basel, 1990, 80: 113~ 126
- Sakai T. 1976. Crabs of Japan and adjacent seas. Kodansha, Tokyo, Japan. 1~ 773
- Saito M, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for restriction phylogenetic tree. Mol Biol Evol, 4: 406~ 425
- Sneath P H A, Sokal R R. 1973. In Numerical Taxonomy, Freeman, San Francisco
- Zhang J, Lu R H. 1992. Annual variation in hepatopancreas-esterase isozymes of two kinds of mitten crabs. Genetics in Aquaculture IV, 32
- Williams J G K, Kubelik A R, Livak J, et al. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res, 18: 6531~ 6535

PHYLOGENESIS OF POPULATIONS OF MITTEN CRABS (*EROCHEIR SINENSIS*, *E. JAPONICUS*) IN SIX RIVER SYSTEMS OF MAINLAND CHINA: RAPD FINGERPRINTING MARKER

LI Si Fa, ZOU Shu-Ming

(Key Laboratory of Ecology and Physiology in Aquaculture of Ministry of Agriculture, Shanghai Fisheries University, 200090)

ABSTRACT RAPD was employed to assess the genetic variations among 6 *Eriocheir sinensis* and *Eriocheir japonicus* populations distributed in Liaohe, Yellow, Yangtze, Oujiang, Pearl and Nanliu River systems. (1) Two primers could amplify distinctive bands in 48 polymorphic 10-mer primers. The 880bp band amplified by primer Z2 was characterized only by Pearl and Nanliu River populations, and the 700bp band was characterized only by Yangtze, Yellow, Liaohe and Oujiang River populations, both bands can be used as fingerprinting marker to identify *E. sinensis* and *E. japonicus*. (2) The frequency of 947bp band amplified by primer Opp17 declined from south to north, e. g., Yangtze River population (87.50%), Yellow River population (41.66%) and Liaohe River population (10.83%). (3) The average genetic similarity index within each population ranked as Liaohe River 0.908 > Nanliu River 0.897 > Oujiang River and Pearl River 0.895 > Yellow River 0.890 > Yantze River 0.850. The genetic distances and their UPGMA and NJ dendrogram of six populations indicated that there was an obvious divergence between Pearl River, Nanliu River populations in southern China and Liaohe River, Yellow River and Yangtze River populations in northern China.

KEYWORDS *Eriocheir sinensis*, *Eriocheir japonicus*, Population, Phylogenesis, RAPD Fingerprinting marker