

文章编号: 1000- 0615(2002)06- 0493- 05

欧、美中华绒螯蟹源于中国长江水系 中华绒螯蟹的遗传证据

李思发, 邹曙明

(上海水产大学农业部水产种质资源与养殖生态、重点开放实验室, 上海 200090)

摘要: 用包括 Z2 和 Opp17 两个 10 碱基随机引物在内的 10 个引物, 对来自荷兰斯科克莱(Skokely)、美国加州圣何塞(San Jose) 的中华绒螯蟹群体与中国长江水系中华绒螯蟹群体进行 RAPD 遗传比较分析。结果发现: (1) 中华绒螯蟹群体特有的 Z2 引物扩增的 700bp 标记带 ($Z2^{700bp}$), 在荷兰与美国 2 个中华绒螯蟹群体中同时出现, 而不出现日本绒螯蟹南流江种群中特有的 880bp 标记带 ($Z2^{880bp}$), 表明欧洲、美国中华绒螯蟹与中国中华绒螯蟹为同种 *Eriocheir sinensis*, 而非日本绒螯蟹 *Eriocheir japonicus*; (2) Opp17 引物扩增的 947bp 片段在中国长江、荷兰及美国 3 个中华绒螯蟹群体内的出现频率均达 100%。结合 Z2 引物扩增结果, 欧洲与美国中华绒螯蟹群体极可能是从中国长江水系中华绒螯蟹引入繁衍的。

关键词: 中华绒螯蟹; 中国; 美国; 欧洲; 长江

中图分类号: S963.21 文献标识码: A

Genetic evidence of immigration of *Eriocheir sinensis* in Europe and USA from Yangtze River in China

LI Si-fa, ZOU Shu-ming

(Key Laboratory of Aquatic Genetic Resources and Aquacultural Ecosystem Certificated by the Ministry of Agriculture, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract: RAPD analysis amplified by ten 10-mer random primers including Z2 and Opp17 was used to compare the genetic variations among three mitten crab populations from Skokely in Holland (Europe), San Jose of California in United States, and the Yangtze River in China. The results showed (1) The $Z2^{700bp}$ band, genetic identification marker in mitten crab *Eriocheir sinensis*, can be amplified in both Europe and North America populations. However, the $Z2^{880bp}$ band, genetic identification marker in mitten crab *Eriocheir Japonica*, can not be amplified in these two populations. It indicated that the mitten crab in Europe, USA, and China were the same species of *Eriocheir sinensis* but not the *Eriocheir japonica*; (2) The frequency of 947bp band amplified by primer Opp17 all reached 100% in above three populations. Combining of results from primer Opp17 with results from primer Z2, it indicated that it is most possible that examined mitten crab populations from Europe and USA were immigrated from the population of the Yangtze River of China.

Key words: *Eriocheir sinensis*; China; USA; Europe; Yangtze River

收稿日期: 2002-03-28

资助项目: 国家“九五”科技攻关项目(96-008-01-03-05)

作者简介: 李思发(1938-), 男, 江苏镇江人, 教授, 博导, 主要从事水产动物种质资源和开发利用研究。Tel: 021-65710333, E-mail:

lisifak@online.sh.cn

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*) 属节肢动物门(Arthropoda)、甲壳纲(Crustacea)、十足目(Decapoda)、方蟹科(Grapsidae)、绒螯蟹属(*Eriocheir*), 自然分布于中国南至浙江瓯江, 北至辽宁鸭绿江口的东部沿海河流湖泊, 朝鲜也有少量分布。同属的近缘种还有日本绒螯蟹(*Eriocheir japonicus*), 直额绒螯蟹(*E. rectus*)及狭额绒螯蟹(*E. leptognathus*)等。日本绒螯蟹主要分布在从闽江、珠江流域到广西南流江流域的南方沿海地区, 个体较大, 也有养殖价值; 直额绒螯蟹和狭额绒螯蟹个体较小, 无多大经济价值。这几种绒螯蟹统称河蟹, 原本是东亚的土著生物^[1-3]。但自20世纪初以来, 中华绒螯蟹已移居并繁衍于欧美大陆沿海, 并在莱茵河河口地区和旧金山湾形成了数量可观的地方群体。

在欧洲, 中华绒螯蟹最早于1912年发现于德国Weser河^[4], 1920年起, 它迅速扩散至荷兰、比利时、丹麦、法国、德国、英国等欧洲国家沿海的各大河流^[5-8]。在北美, 1965年伊利(Erie)湖附近的Detroit河发现首只中华绒螯蟹, 1973年于该湖小批量捕到^[9], 1987年发现于密西西比河的Louisiana^[10], 1992年发现于太平洋沿岸的旧金山湾, 1994年后大量繁衍后代^[11]。中华绒螯蟹在欧、美大陆的移居和繁衍, 已引起了养殖学家、生态学家以及产业界人士的兴趣和注意。

本文报道应用RAPD技术对来自荷兰斯科克莱(Skokely)、美国加州圣何塞(San Jose)的中华绒螯蟹群体与中国长江水系中华绒螯蟹群体的基因组进行比较分析的结果, 它首次披露了欧洲、美国中华绒螯蟹和中国大陆中华绒螯蟹群体间关系的遗传依据。

1 材料和方法

1.1 材料

中国中华绒螯蟹(以下简称长江河蟹)30只, 1998年11月取自江苏镇江长江干流, 平均体重139.8g, 掰下蟹腿置于95%酒精中分别保存。美国中华绒螯蟹(以下简称加洲河蟹)20只, 1998年8月采自加利福尼亚州圣何塞市, 体重102.5~220.8g, 95%酒精保存。荷兰中华绒螯蟹(以下简称荷兰河蟹)3只, 2001年8月捕自荷兰斯科克莱, 平均体重为75.0g, 95%酒精保存。

1.2 方法

1.2.1 基因组DNA的提取

取保存于95%酒精的蟹腿, 剪开蟹腿硬壳, 取0.2g左右蟹腿肌肉, 置于无菌干净的研钵内研成粉末后, 转入1.5mL的Eppendorf管中, 加入1mL左右的无菌重蒸水振荡几秒钟后, 5000 r·min⁻¹离心3min, 去上清, 加入400mL STE缓冲液(30mmol·L⁻¹ Tris-HCl, pH8.0, 200mmol·L⁻¹ EDTA, 50mmol·L⁻¹ NaCl)。混匀后加入终浓度分别为1% SDS和200μg·L⁻¹蛋白酶K, 56℃作用过夜。DNA的抽提、沉淀、干燥、溶解见文献[12]。

1.2.2 基因组DNA的RAPD分析

对提取的基因组样品进行RAPD分析。根据作者以前的研究结果^[12], Z2(CTTTCGCTCC)引物能够扩增出中华绒螯蟹特有700bp片段和日本绒螯蟹南流江种群特有的880bp片段; Opp17(TGACCCGCT)引物扩增的947bp片段的出现频率可作为区别中国长江水系同辽河、黄河水系中华绒螯蟹种群的依据。

2 结果

用Z2引物和Opp17引物对3群体共12只个体(长江河蟹5只, 荷兰河蟹3只和加洲河蟹4只)的基因组进行PCR扩增, 扩增结果稳定, 重复性佳, 表明经酒精保存的河蟹肌肉样品可以提取DNA进行随机引物PCR扩增。

在试验的3个群体、12只个体中, Z2引物扩增的700bp片段都存在, 而Z2扩增的880bp片段都不存在(图1, 图2), 即荷兰河蟹和加洲河蟹同长江河蟹有着相同的遗传标记。这表明, 荷兰河蟹和加洲河蟹来源于中华绒螯蟹; 由于这两个群体没有日本绒螯蟹种群所特有的880bp片段, 故可排除他们来源于日本绒螯蟹的可能性。

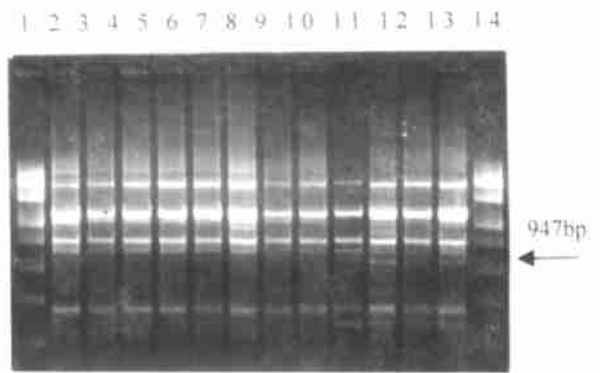
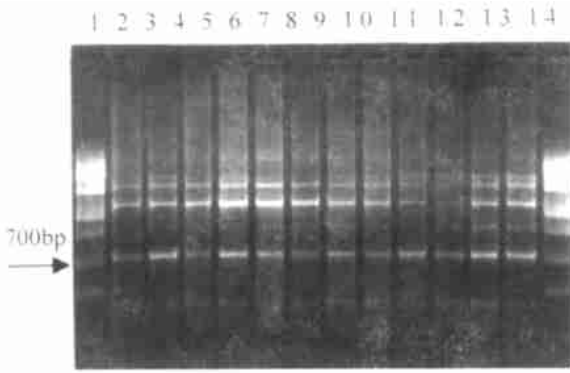


图1 Z2引物扩增结果(2-4: 荷兰河蟹; 5-9: 长江河蟹; 10-13: 美国河蟹; 1, 14为200bp Marker)

Fig. 1 The amplified results of Primer Z2(2-4: Holland population; 5-9: Yangzhi River population; 10-13: North America population; 1, 14 as 200bp Marker)

图2 Opp17引物扩增结果(2-4: 荷兰河蟹; 5-9: 长江河蟹; 10-13: 美国河蟹; 1, 14为200bp Marker)

Fig. 2 The amplified results of Primer Opp17(2-4: Holland population; 5-9: Yangzhi River population; 10-13: North America population; 1, 14 as 200bp Marker)

进一步试验分析表明, Opp17引物扩增的947bp片段在长江河蟹、加洲河蟹和荷兰河蟹3群体均存在(图2), 个体内出现频率均为100%; 根据作者以前的研究结果^[12], 该片段在中国辽河、黄河、长江瓯江四个中华绒螯蟹种群内的出现频率, 长江种群最高(87.50%), 瓯江种群次之(78.26%), 黄河种群为41.66%, 辽河种群为10.83%。由此认为, 荷兰河蟹和加洲河蟹和长江水系河蟹同源。

综合Z2引物和Opp17引物的扩增结果, 作者认为, 所测欧洲荷兰河蟹和美国加洲河蟹和中华绒螯蟹为同种, 而且极有可能是来自长江水系的中华绒螯蟹种群。

3 讨论

3.1 河蟹在欧美的移殖和扩展

在欧洲, 第1只河蟹于1912年在德国Rethan的Weser河被发现, 被假定是随轮船压舱水(ballasting water)由中国引入的^[5]。至1930年, 其分布已遍及北海沿岸的荷兰、比利时、丹麦及英国。英国于1935年在泰晤士河发现河蟹, 群体逐年增大^[4, 13]。随后, 河蟹逐步向西向东扩散。向西是向法国北部扩散^[14], 到达法国西部大西洋海域, 又通过加勒(Garonne)河和都米地(du Midi)运河, 于1959年到达地中海沿岸^[15]; 向东则是向波罗的海扩张, 进入沿海的芬兰和瑞典。在欧洲, 目前以北海沿岸的荷兰、比利时及德国沿海地区河蟹地方群体的数量最大, 泛滥成灾, 可能与莱茵河河口地区更适合其繁殖, 以及该河宽广腹地较适合其生长有关。目前有一定数量欧产河蟹远销新加坡(赵乃刚, 私人通讯)。至于欧洲河蟹的来源, 有学者推测最早引入德国的河蟹来自中国福建省以东、朝鲜半岛以西的东亚沿海地区^[4]。

在美国, 河蟹1965年首次发现在大西洋一侧进入大湖区的Detroit河, 1973年以后, 在艾利(Erie)湖可小量捕到成蟹, 体重124.5~201.1g^[9]。不过, 河蟹最终未能在美国东北部五大湖区和大西洋沿岸形成较大群体, 这可能与大湖区湖水太淡, 达不到河蟹繁殖所需要的盐度有关。Nepszy和Leach^[9]认为, 在美国五大湖区域发现的河蟹是从欧洲移入的。

在美国西南部的加州太平洋沿岸, 河蟹第一次被发现在1992年, 是捕虾船在旧金山海湾南部捕到的。以后, 河蟹遍布旧金山海湾, 并广泛洄游至该流域的大小河流。尽管该地区河蟹出现较晚, 但到1998年, 该区域河蟹种群数量就已达到可捕规模。大闸蟹(河蟹在海内外的商品名)乃是亚裔人嗜好的美味佳肴, 20世纪60-80年代曾出现于旧金山和纽约市场[赵乃刚, 私人通讯]。每kg售价高达30美元左右。但后来美国当局严禁河蟹的商业进口或引种。一般认为, 旧金山湾区河蟹的定居, 是由于20世纪60-80年代以来与中国大陆的河蟹贸易引起的, 即河蟹从中国进口后因逃逸或无意放流而造

成^[11]。

目前,在欧美尚未见到河蟹的商业捕捞统计资料。但中华绒螯蟹定居并大量繁衍已成事实,并开始产生较大影响。它一方面形成了可供捕捞生产和贸易的商机。如在新加坡市场上,出现了产自欧洲的河蟹;另一方面,也引起了对这一生物入侵可能产生的影响的忧虑,如对其他天然水生生物种群、工农业水利设施等的危害,乃至它作为卫氏并殖吸虫 *Paragonomus westermanii* 第二中间寄主对人类健康的影响等^[5,11]。其实,中华绒螯蟹并非卫氏并殖吸虫的中间寄主[赵乃刚,私人通讯]。

中华绒螯蟹在不到 100 年间移居并繁衍于欧美大陆的成功启示我们,这一重要的水生动物具有极其顽强的适应能力。这一特性正是我们对其开展养殖、或保护、或控制所需要的。

3.2 欧美河蟹来源于长江水系中华绒螯蟹的分子遗传学证明

根据我们对河蟹 RAPD 分析的研究结果^[12],引物 Z2 具有群体特异性带,其扩增的 Z2⁸⁰⁰bp 片段为珠江蟹和南流江蟹群体中所特有,这 2 个群体均属日本绒螯蟹;而扩增的 Z2⁷⁰⁰bp 片段为长江蟹、辽河蟹、黄河蟹及瓯江蟹所特有,这 4 个群体均属中华绒螯蟹。因此,Z2⁸⁰⁰与 Z2⁷⁰⁰bp 片段可分别作为日本绒螯蟹和中华绒螯蟹的分子遗传标记。本研究用 Z2 引物同时对荷兰河蟹、美国加州河蟹与中国长江水系河蟹进行 RAPD 分析,扩增出的 Z2⁷⁰⁰bp 标记带,在荷兰河蟹与美国加州河蟹 2 个群体中同时出现,但不出现日本绒螯蟹种群特有的 Z2⁸⁰⁰bp 标记带,表明这两个欧美河蟹群体来源于中华绒螯蟹。那么,他们又来自长江蟹、辽河蟹、黄河蟹或瓯江蟹中的哪个群体呢?

根据我们以前的研究结果^[12],Opp17 扩增的 947bp 片段的出现频率在长江水系中华绒螯蟹群体内出现频率最高,大样本(30 个)测定为 87.50%,小样本(4 个)测定为 100%,而大样本测定时,瓯江蟹为 78.26%、黄河蟹为 41.66%、辽河蟹为 10.83%。本研究用 Opp17 引物扩增的 947bp 片段的出现频率在中国长江河蟹、欧洲荷兰蟹及美国加州河蟹 3 个群体均达 100%。上述出现频率的一致,表明这两个河蟹群体来源的范围应在长江水系。

从目前收集到的文献看,经形态分类学鉴定,引入欧洲的河蟹为中华绒螯蟹^[5],引入美国的河蟹也是中华绒螯蟹^[11]。由于欧洲和美国幅员辽阔,引入河蟹已数十年,不排除从多地或多次引进的可能性。本试验所采集的荷兰河蟹与加州河蟹均捕自当地繁育群体,而这两个群体可分别代表欧洲和美国的优势群体。本试验的 RAPD 分析结果,提供了欧洲河蟹、美国河蟹和中国长江河蟹同属中华绒螯蟹,且欧、美中华绒螯蟹极可能源于中国长江水系中华绒螯蟹的遗传证据。

美国加州中华绒螯蟹系我国河蟹人工繁殖先驱和养殖专家赵乃刚先生从美国带回馈赠,荷兰中华绒螯蟹系荷兰 Wageningen 大学 Li Yueming 博士从荷兰带回馈赠,特此致谢。

参考文献:

- [1] Stimpson W. Report on the Crustacea (Brachyura and Anomura) collected by the North Pacific Exploring Expedition 1856-58[R]. Smithsonian Misc Coll. 1907, 49: 1-240, pls 1-26.
- [2] Dai A Y. Studies on the subspecies differentiation of the genus *Eriocheir* (Decapoda: Brachyura) [C]. 1991, 1: 61-71. [戴爱云. 绒螯蟹属亚种分化的研究(十足目:短尾派)[C]. 系统进化动物学重点实验室论文集, 1991, 1: 61-71.]
- [3] Guo J K, Ng N K, Dai A, et al. The taxonomy of three commercially important species of mitten crabs of the genus *Eriocheir* de Haan, 1835 (Crustacea: Decapoda: Brachyura: Grapsilae) [J]. Raffles Bull Zool, 1997, 45(2): 445-476.
- [4] Ingle R W, Andrews M J. Chinese crab reappears in Britain [J]. Nature, 1976, 263: 638.
- [5] Panning A. The Chinese mitten crab [R]. Annual Report, Smithsonian Institution, 1939, 1938: 361-375.
- [6] Gordon I. The mitten crab - a Chinese immigrant to Europe [N]. In: Illustr London News, 1947, 4 October, 384.
- [7] Haahela I. Some new observations and remarks on the occurrence of the mitten crab, *Eriocheir sinensis* Milne-Edwards (Crustacea, Decapoda), in Finland [J]. Aquilo Ser Zool, 1963, 1: 9-16.
- [8] Ingle R W. The Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* H. Milne Edwards - a contentious immigrant [J]. Lond Nat, 1986, 65: 101-105.
- [9] Nepsy S Y, Leach J H. First records of the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis* (Crustacea: Brachyura) from North America [J]. Journal of the Fisheries Research Board of Canada, 1973, 30: 1909-1910.

- [10] Horwath J L. Importation or shipment of injurious wildlife: mitten crabs[J]. U S Fed Reg, 1989, 54(98): 22286- 22289.
- [11] Cohen A N, Carlton J T. Transoceanic transport mechanism: introduction of the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*, to California[J]. Pac Sci, 1997, 51:1- 11.
- [12] Li S F, Zou S M. Phylogenesis and identification of mitten crab (*Eriocheir sinensis* and *Eriocheir japonicus*) in six river systems of mainland China: RAPD fingerprinting marker[J]. Journal of Fisheries of China, 1999, 23(4): 325- 330. [李思发, 邹曙明. 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: RAPD 指纹标记[J]. 水产学报, 1999, 23(4): 325- 330.]
- [13] Peters N. Lebenskundlicher teil[A]. In: N Peters and A Panning eds. Die Chinesische Wollhandkrabbe (*Eriocheir sinensis* H. Milne-Edwards) in Deutschland[M]. Akademische Verlagsgesellschaft M B H, Leipzig. we, 1933.59- 156
- [14] Hoestland H. Recherches sur la biologie de l' *Eriocheir sinensis* en France (Crustace Brachyoure)[J]. Ann Inst Oceanogr Monaco, 1948, 24 (1):1- 116.
- [15] Hoestland H. Repartition actuelle du crabe chinois (*Eriocheir sinensis* H. Milne Edwards)[J]. Bull Fr Piscic, 1959,194: 5- 14.

编委简介

赵法箴, 男, 1935 年出生, 山东莱州人。中国工程院院士, 海洋水产养殖学家、研究员。历任黄海水产研究所研究员、名誉所长、养殖研究中心主任、农业部海水增养殖病害与生态重点开放实验室主任。为山东省五届人大代表, 第七、八届全国政协委员, 中国水产学会副理事长, 中国农学会常务理事, 中国海洋湖沼学会常务理事兼生态学会副理事长, 全国海洋资源研究开发保护专家组成员。

赵法箴院士自上世纪 50 年代末期以来, 长期从事对虾养殖和实验生态科研工作, 摸清了对虾的生物学和生态学特性, 阐明了对虾育苗和养殖的科学论据, 在应用技术上取得重大科研成果并主持及时推广, 开创和推动了中国对虾增养殖业的迅速发展, 使之形成规模化产业, 取得了十分显著的经济效益和社会效益。赵法箴院士撰有《对虾幼体发育形态》等论文 30 篇。主要著作有《对虾养殖》、《人工养殖对虾》(1979)、《对虾幼体发育形态》(1965)。

赵法箴院士获得的主要科技奖励有:《对虾人工育苗及精养高产技术的研究》于 1978 年获全国科技大会奖;《对虾人工配合饵料研究》于 1987 年获国家科学技术进步二等奖;《对虾工厂化全人工育苗技术》于 1985 年获国家科学技术进步奖一等奖和世界知识产权组织特别奖金奖。1986 年被授予国家级有突出贡献中青年专家称号, 1990 年首批获国务院颁发的政府特殊津贴。