

RAPD 标记鉴别中华绒螯蟹种群的初步研究^{*}

周开亚 高志千

(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 200 个随机引物对中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 辽河种群、长江种群和瓯江种群进行了 RAPD 遗传标记鉴别研究,其中引物 HX01 和 HX02 检测到瓯江种群和辽河种群所有样品共有的 HX01-0.4 和 HX02-0.7 扩增片段, M_r 分别为 0.4 kb 和 0.7 kb. 这两个扩增片段在模板 DNA 浓度作上下 50% 的改变、或在镁离子和引物浓度分别作上下 25% 的改变时仍稳定出现,而长江种群样品的 PCR 反应中无这两个扩增片段出现,因而可作为长江种群的鉴别标记. 用上述标记检查一些人工养殖的河蟹,发现一些苗种场的蟹苗种质严重混杂. 未发现可以区分瓯江种群和辽河种群的标记.

关键词 中华绒螯蟹; 种群鉴别; RAPD 标记

中图法分类号 Q959.223.630.8 : Q349.1 : Q343.12

IDENTIFICATION OF THE MITTEN CRAB *ERIOCHEIR SINENSIS* POPULATIONS USING RAPD MARKERS

ZHOU Kaiya & GAO Zhiqian

(Biodiversity and Molecular Evolution Laboratory, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, P. R. China)

Abstract The mitten crab *Eriocheir sinensis* is cultured extensively in coastal areas of China. Three populations named as Oujiang, Liaohe and Yangtze with different commercial traits are morphologically difficult to distinguish. RAPD was applied to the identification of *Eriocheir sinensis* populations mentioned above. Among 200 random primers screened, two primers (HX01 and HX02) generate a fragment M_r (HX01) = 0.4 kb and M_r (HX02) = 0.7 kb respectively in both Oujiang and Liaohe populations while they are absent in Yangtze population. Both fragments are reproducible under the 50 % changes of the template DNA concentration, or 25 % changes of the $MgCl_2$ and primer concentrations, and are selected as identification markers for Yangtze population. Using those markers, we found that only 29.3 % of the 41 samples from seed-crab farms in Jiangsu and Anhui were identified to be Yangtze population as they were declared. No markers were found to distinguish Oujiang population and Liaohe population in the this study.

Keywords *Eriocheir sinensis*; population identification; RAPD marker

中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*), 又称河蟹、螃蟹、毛蟹, 是我国名贵水产品, 分布于我国北纬 24° 以北至朝鲜西部沿岸水域^[1]. 目前河蟹养殖业的蟹苗主要产于长江、辽河和瓯江三个水系, 其中以长江水系的品质最佳, 经济价值最高. 然而由于滥捕、环境污染等原因, 长江水系蟹苗自然资源已近枯竭. 辽河、瓯江等水系的幼蟹大量流入长江中下游地区, 导致种质的混杂, 对养殖生产带来严重影响, 许多养殖户遭受巨大经济损失.

由于地理分布及生产性状的差异, 这三个水系的中华绒螯蟹被视为不同的种群, 但仅用形态学方法不易鉴别. 最近, 许加武等^[2]发表了长江、辽河和瓯江中华绒螯蟹种群的形态判别方法, 对成蟹的拟合概率约达 90%, 尚存在一定的误判率, 尤其对于河蟹养殖中幼蟹和蟹苗这两个重要阶段, 利用形态特征仍不能鉴别. 同

工酶研究虽揭示中华绒螯蟹长江种群分别与辽河种群、瓯江种群个体存在 EST 和 MDH 同工酶差异^[3,4], 尚未见用于种群鉴别的报道. 邱涛等^[5]应用 RAPD 技术对辽河、长江和瓯江中华绒螯蟹种群进行了遗传多样性分析, 但未得到种群间的鉴别标记. 作者从 200 个随机引物筛选出 31 个随机引物, 对这三个种群进行了 RAPD 分析, 表明中华绒螯蟹种内遗传变异较低^[6], 本文报道长江种群与另两个种群间的 RAPD 鉴别标记, 并对江苏、安徽等地人工养殖的河蟹样品进行了鉴别.

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(8♂, 8♀)、丹东(4♂, 4♀), 长江种群成体采自江苏省高淳县固城湖(4♂, 4♀)、启东市海复(成体 3♂, 3♀, 幼体 1♂), 瓯江种群成体采自浙江省乐清(4♂, 4♀)和宁城(7♂, 1♀). 人工养殖河蟹 41 只分别采自安徽省当涂, 江苏省高淳、启东、盱眙, 其中 26 只为幼体. 所有样品 -20℃ 保存.

1.2 基因组 DNA 提取和 PCR 反应体系

参考 Sambrook 等^[7]提取基因组 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. 反应总体积为 40 μL [$c(\text{Tris-Cl}) = 10 \text{ mmol/L}$ (pH 8.3), $c(\text{KCl}) = 50 \text{ mmol/L}$, $c(\text{MgCl}_2) = 2 \text{ mmol/L}$, 明胶 $w = 0.01\%$, 每种 dNTP 的 $c = 100 \text{ mmol/L}$, 15 ng 随机引物, 50 ng 模板 DNA, 1 单位 *Taq* 酶(Promega)], 2 滴石蜡油覆盖. 反应在 1109 基因扩增仪或 SRX-481 基因扩增仪上进行. 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.

1.3 引物筛选

对随机选取的 1 个样品进行 PCR 反应, 在 200 个 10 bp 随机引物中选出相同条件下两次重复扩增结果稳定的引物 72 个. 每个种群随机选取 5 个样品的 DNA 等量混合代表该群体, 用这 72 个引物分别对其进行扩增, 选出显示出种群间差异的引物. 再用后者对每个种群所有个体的 DNA 扩增, 寻找鉴别标记.

1.4 鉴别标记的可重复性试验

受 PCR 本身的特点制约, RAPD 反应的一些扩增片段重复性较差, 易出现伪带^[8~10]. 为得到可重复的种群鉴别标记, 用得到 RAPD 标记的引物多次重复进行 PCR 反应, 并把模板 DNA 浓度作上下 50% 的改变、或分别把镁离子和引物浓度作上下 25% 的改变(表 1), 在这些反应条件下均可重复的 RAPD 标记作为种群鉴别标记.

表 1 RAPD 鉴别引物可重复性扩增试验条件(40 μL 反应体积)
Table 1 Amplification conditions for testing the reproducibility of the primers selected for population identification (in 40 μL volume)

处理 Treatment	模板 DNA Template DNA (m/ng)	$c(\text{MgCl}_2)/\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	引物 Primer (m/ng)
1	150	2.0	15
2	50	2.0	15
3	100	2.0	11.5
4	100	2.0	18.75
5	100	1.5	15
6	100	2.5	15

1.5 人工养殖河蟹的鉴别

通过 PCR 反应, 根据种群鉴别标记有无对江苏、安徽一些苗种场和养殖户的河蟹样品进行鉴别.

2 结果

72 个引物中有 20 个引物在对混合样品扩增时显示出种群差别, 但对所有样品扩增时只有引物 HX01 和 HX02 的扩增产物在长江种群与瓯江、辽河种群间存在差别. 未发现可以区分瓯江种群和辽河种群的标记.

上述 20 个引物对每个种群所有个体扩增结果, 单个引物扩增片段 1~15 个, M_r 在 0.3~3.5 kb 之间.

引物 HX01 扩增出 14 个片段, M_r 在 0.4~1.8 kb 之间, 其中 $M_r(\text{HX01})$ 为 1.8, 1.6, 1.39, 0.84, 0.76, 0.7, 0.65, 0.55 和 0.47 kb 等的片段为 3 个种群的共有片段; 1.26, 1.15, 1.07, 0.98, 0.4 kb 等的为多态片段. M_r

(HX01) = 0.4 kb 的片段为瓯江种群和辽河种群所共有, 长江种群在这一位置无 DNA 片段(图 1A)。

引物 HX02 扩增出 9 个 DNA 片段, M_r 在 0.6 ~ 1.9 kb 之间, 其中 M_r (HX02) 为 1.9, 1.6, 1.4, 1.3, 1.2, 1.1, 1.0 和 0.6 kb 等 8 个片段为 3 个种群的共有片段. M_r (HX02) = 0.7 kb 的为瓯江种群和辽河种群所有样品共有, 长江种群在同一位置无 DNA 片段(图 1B)。

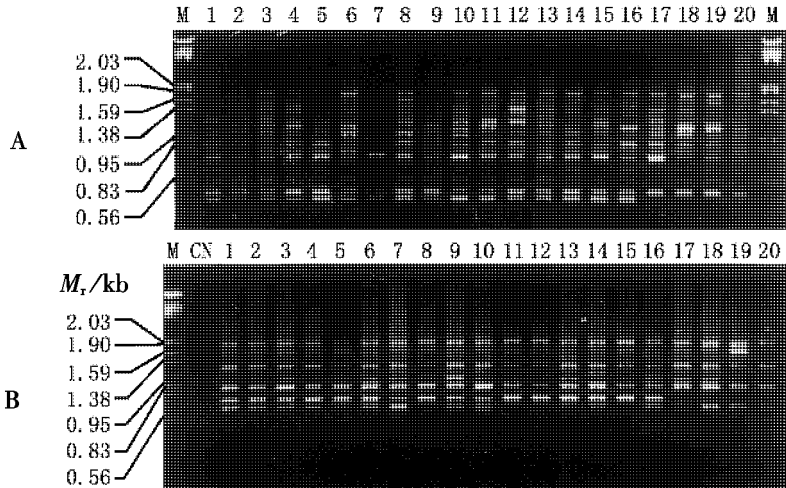


图 1 中华绒螯蟹 RAPD 图谱. A. 引物 HX01. 长江种群个体无 0.4 kb 扩增片段. B. 引物 HX02. 长江种群个体无 0.7 kb 扩增片段. 1 ~ 8 为瓯江种群样品. 9 ~ 16 为辽河种群样品. 17 ~ 20 为长江种群样品. M 为 λ DNA *EcoRI/HindIII* M_r /kb 标记; CN 为空白对照.

Fig. 1 RAPD products generated from the genomic DNA of *Eriocheir sinensis*. A. Primer HX01. A 0.4 kb fragment present in Oujiang population and Liaohu population, absent in Yangtze population. B. Primer HX02. A 0.7 kb fragment present in Oujiang population and Liaohu population, absent in Yangtze population. 1 ~ 8, 9 ~ 16, 17 ~ 20. Samples of Oujiang population, Liaohu population and Yangtze population, respectively. M: λ DNA *EcoRI/HindIII* size marker in M_r /kb. CN: Negative control.

可重复性试验结果, 对瓯江种群和辽河种群的样品反复多次进行了 PCR 反应及换用不同的基因扩增仪, M_r (HX01) = 0.4 kb 和 M_r (HX02) = 0.7 kb 的这两个扩增片段均稳定出现, 而对长江种群样品的 PCR 反应则无这两个扩增片段出现. 引物 HX01 和 HX02 对随机选取的辽河种群 1 个样品的扩增结果在模板 DNA、镁离子或引物浓度上下变动时也可以重复. 因此这两个标记可应用于长江种群的鉴别.

RAPD 标记属显性遗传^[8], 即标记片段的有和无分别为显性和隐性, 纯合子和杂合子均产生相同的扩增带^[9,10]. 本文得到的两个鉴别标记在长江种群个体为隐性纯合, 在瓯江和辽河种群个体则为显性纯合. 运用两个隐性标记鉴定长江种群可以排除这两个位点上的杂合子, 鉴别准确性要高于两个显性标记.

用上述鉴别标记, 对江苏、安徽一些苗种场和养殖户的河蟹样品进行了鉴别, 无扩增片段 HX01-0.4 和 HX02-0.7 的记录为长江中华绒螯蟹, 有这两个扩增片段的则不是长江中华绒螯蟹. 结果表明, 人工养殖中华绒螯蟹的种质十分混杂(表 2). 41 只河蟹样品中仅有 12 只被鉴定为长江种群, 占 29.3%; 另有 10 只鉴别标记同辽河和瓯江种群; 其余 19 只与上述 3 个种群均不同, 且除 2 只为 HX01-0.4 (+)/HX02-0.7 (-) 外, 几乎均为 HX01-0.4 (-)/HX02-0.7 (+), 由于对这两个标记的遗传背景尚不清楚, 这些个体是来源于种群杂交还是来源于其它种群尚不能确定, 但可以认为它们不是长江种群个体.

在取样的中华绒螯蟹苗种场中, 除高淳某苗种场提供的 2 只河蟹样品(表 2. No. 16-17)全部鉴定为长江蟹外, 其余 3 个苗种场均存在严重的种质混杂现象. 当涂某苗种场的 11 只样品(表 2. No. 1-11)仅有 3 只鉴定为长江蟹, 占 27.3%. 启东某苗种场 11 只样品(表 2. No. 18-27)仅 4 只鉴定为长江蟹, 占 36.4%. 而宝应某苗种场的 8 只样品(表 2. No. 34-41)仅 1 只鉴定为长江蟹, 只占 12.5%.

1996 年高淳县漕塘乡某养殖户养殖效益不好. 经分析, 其提供的 2 只成体河蟹样品(表 2. No. 12-13)均不

是长江蟹,两只幼蟹也只有一只鉴定为长江蟹(表 2.No.14-15).1997 年盱眙县仁集乡河蟹养殖失败,而其提供的 6 只样品(表 2. No.28-33)仅有 1 只鉴定为长江蟹.可见种质混杂是他们养殖失败的重要原因之一.

表 2 人工养殖中华绒螯蟹样品的 RAPD 标记鉴别
Table 2 Identification of cultured *Eriocheir sinensis* using RAPD markers

编号* No.	年龄 Age	性别 Sex	HX01-0.4	HX02-0.7	鉴别结果 Identification	编号* No.	年龄 Age	性别 Sex	HX01-0.4	HX02-0.7	鉴别结果 Identification
01	L	♂	-	-	Y	22	A	♀	-	-	Y
02	L	♂	-	+	N	23	A	♂	-	-	Y
03	L	♀	-	+	N	24	A	♂	-	+	N
04	L	♂	+	+	N	25	A	♂	-	+	N
05	L	♂	+	+	N	26	A	♀	-	+	N
06	A	♀	+	+	N	27	A	♂	-	+	N
07	A	♂	-	+	N	28	L	♂	+	-	N
08	A	♂	-	-	Y	29	L	♀	-	+	N
09	A	♂	+	+	N	30	L	♂	-	+	N
10	A	♀	-	-	Y	31	L	♀	-	+	N
11	L	♂	-	+	N	32	L	♀	-	+	N
12	A	♂	+	+	N	33	L	♀	-	-	Y
13	A	♂	+	+	N	34	L	♂	-	+	N
14	L	♀	+	+	N	35	L	♂	-	+	N
15	L	♀	-	-	Y	36	L	♀	-	-	Y
16	L	♂	-	-	Y	37	L	♂	+	+	N
17	L	♀	-	-	Y	38	L	♀	+	+	N
18	L	♀	-	+	N	39	L	♀	+	+	N
19	L	♂	-	-	Y	40	L	♂	-	+	N
20	A	♀	-	-	Y	41	L	♀	+	-	N
21	A	♀	-	+	N						

* 01-11:当涂;12-17:高淳;18-27:启东;28-33:盱眙;34-41:宝应;+/-有/无. Y/N:是/否长江种群.A:成体;L:幼体
01-11: Dangtu, 12-17: Gaooun, 18-27: Qidong, 28-33: Xuyu, 34-41: Baoying. +/-: present/absent. Y/N: identified as Yangtze population or not. A:Adult; L:larva

3 讨论

近二十年来,我国的中华绒螯蟹养殖业发展很快,但对于其种群鉴别问题一直缺乏研究.近年来由于长江水系蟹苗供不应求,从其它水系引进的蟹苗使养殖生产受到损失,中华绒螯蟹的种群鉴别问题才受到关注^[2~5].但迄今尚无可鉴别长江种群的 DNA 分子遗传标记报道.

本文用 200 个引物筛选得到了区别长江种群与辽河和瓯江种群的 RAPD 标记,表明 RAPD 在十足目动物鉴别研究中是一种可用的方法.而邱涛等^[5]未能得到种群鉴别标记可能与所用引物较少有关.

相对于形态标记和同功酶,RAPD 技术快速,简便,所需样品少,只需一节附肢即可,不影响动物生长和繁殖,且不受动物发育时期的影响,因而在亲蟹、幼蟹甚至蟹苗时期都能准确鉴别,是进行中华绒螯蟹种群鉴别的有效方法.它为利用分子生物学手段辅助育种和控制种质混杂问题提供了可能.但由于本研究只涉及 3 个种群,且找到的鉴别标记太少,更准确的种群鉴别方法尚待进一步研究.

虽然本文只能鉴别长江水系种群,但该结果提示辽河、长江和瓯江 3 个水系的隔离已使 3 个水系的中华绒螯蟹种群间产生了遗传分化.因此,在中华绒螯蟹种质资源保护工作中应把各种群视为不同的管理单位.然而近年来中华绒螯蟹养殖中种源混杂^[11, 12],对种质资源的保护十分不利.由于兴修水利、环境污染和过度捕捞等因素,目前长江种群资源已近枯竭,外来种群的混入影响了种群的生产性状,并有可能造成该种群优良品质的消失,因而有必要运用分子生物学手段加强养殖生产中种源的控制及对野生中华绒螯蟹资源尤其是长江种群进行遗传监测.

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、郝家胜帮助采集了部分标本,特此致谢.

参考文献

- 1 戴爱云. 绒螯蟹属亚种分化的研究(十足目, 短尾派). 见: 张广学主编. 系统进化动力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
- 2 Xu JW(许加武), Ren MR(任明荣), Li SF(李思发). Morphological identification of population of *Eriocheir sinensis* from Changjiang, Liaohe and Oujiang Rivers. *J Fisheries China* (水产学报). 1997, 21(3): 269 ~ 274
- 3 Wang D(王丹), Yu WJ(于伟君). A comparative study on the isozymes in *Eriocheir sinensis* from Chang Jiang and from Liaohe River. *J Liaoning Univ, Natural Sci Edition* (辽宁大学学报自然科学版). 1995, 22(4): 79 ~ 81
- 4 Zhang J(张洁), Chen LQ(陈立桥), Zhou ZL(周忠良), Tang SX(唐思贤). Study on the developmental genetics of isozymes in Chinese mitten-handed crab. I. Discussion on isozymes in various tissues of Chinese mitten-handed crab from Changjiang River. *J East China Normal Univ, Natural Sci Edition* (华东师范大学学报自然科学版). 1996, 动物学专集: 38 ~ 42
- 5 Qiu T(邱涛), Lu RH(陆仁后), Xiang CM(项超美), Zhang J(张菁). Studies on the genomic DNA genetic diversity in three populations of *Eriocheir sinensis* using RAPD. *Freshwater Fisheries* (淡水渔业). 1997, 27(5): 3 ~ 6
- 6 Gao ZQ(高志千), Zhou KY(周开亚). Genetic variation of the Chinese mitten-handed crab (*Eriocheir sinensis*) populations detected by RAPD analysis. *China Biodiversity* (生物多样性). 1998, 6(3): 186 ~ 190
- 7 Sambrood J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning, a Laboratory Manual, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 464 ~ 467
- 8 Williams GK, Kubelik AR, Livak KL, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl Acids Res*. 1990, 18(22): 6531 ~ 6535
- 9 Chu J, Powers E, Howard DJ. Gene exchange in a ground cricket hybrid zone. *J Heredity*, 1995, 86(1): 17 ~ 21
- 10 Roderick GK. Geographic structure of insect populations: gene flow, phylogeography and their uses. *Annu Rev Entomol*. 1996, 41: 325 ~ 352
- 11 赵仁宣. 谈河蟹人工繁殖中的几个问题. 水产养殖. 1996, (6): 30
- 12 Gu XH(谷孝鸿), Hu WY(胡文英). On the problems in culturing crab and their countermeasures. *Trans Oceanol Limnol* (海洋湖泊通报). 1996, (1): 55 ~ 57

“0.2222”, 意味着什么?

——向本刊作者、审者、读者及所有关心我刊质量的人们致谢

0.2222 是本刊在 CSCD(中国科学引文数据库)系统中的影响因子值(IF_{CSCD}). 根据 CSCD 提供数据: 本刊 1995(创刊年) ~ 1996 年的载文量为 117 篇, 1997 年内被 CSCD 582 种来源期刊引证量为 26, 据 CSCD 公式, 1997 年本刊 $IF_{CSCD} = 26/117 = 0.2222$.

本刊既非 CSCD 的 582 种来源期刊之一, 也因引频次数(也为 26)低而未进入 1998 年 500 名排行榜, 但是:

- CSCD 582 种来源刊中的 55.2% (321/582) 的 $IF_{CSCD} < 0.2222$;
- CSCD 1998 年 500 名排行榜中 47.6% (238/500) 的期刊的 $IF_{CSCD} < 0.2222$; 另有 15% (75/500) 因是非来源期刊因而缺 IF_{CSCD} 数据, 但这部分期刊的 $IF_{CSCD} > 0.2222$ 者不会超过一半. 以此推算, 500 名排行榜中至少也有 55% [(238 + 37)/500] 的期刊 $IF_{CSCD} < 0.2222$.

- 由上推算, 我刊在以 IF_{CSCD} 大小为序的我国科技期刊排序位置当在第 225 名 ~ 261 名之间.

$IF_{CSCD} = 0.2222$ 是对我刊的作者、审者、编者、读者、收藏者及所有为我刊质量操心的朋友们的真诚谢意.