四种十足目甲壳动物遗传差异的RAPD分析*

项超美 陆仁后 谢 浩 刘向宇 张 菁

(中国科学院水生生物研究所，武汉 430072)

摘要 采用RAPD技术，对分类阶元不同的四种十足目甲壳动物：克氏原螯虾、汉水华溪蟹、日本绒螯蟹合浦亚种和中华绒螯蟹，进行了遗传多态性的研究。四个物种DNA库的扩增结果表明，随着亲缘关系由近变远，物种间的相似率依次减小，由56.1%下降到22.3%。用UPGMA方法作聚类分析构建出物种的系统树图，反映出四个物种对应的种、科间、科间以上遗传差异逐步增大，这与以形态标记为主的分类结果相一致。在同工酶分析难以揭示差异的两种绒螯蟹中，用RAPD分析观察到明显的种间差异。两种绒螯蟹个体的扩增图谱分析结果为，中华绒螯蟹个体间的平均相似率为56.9%，日本绒螯蟹合浦亚种个体间为66.1%，两种绒螯蟹个体间的平均相似率则为51.9%。日本绒螯蟹合浦亚种个体间的平均相似率显著高于中华绒螯蟹个体间的平均相似率，异种绒螯蟹个体间的平均相似率显著低于同种个体间的平均相似率.

关键词 RAPD，十足目，多态性

1990年由Williams小组[1]和Welsh小组[2]首创了RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA)技术，这是研究基因组多态性的新方法，具有灵敏、简便、快速的优点，正广泛应用于基因组研究的各个方面。据报道，绒螯蟹显示出很低水平的蛋白质多态性[3,4]，总体而言，在整个十足目也是如此[5,6]。在此背景下，选取分类阶元不同的4种十足目甲壳动物，即中华绒螯蟹、日本绒螯蟹合浦亚种、汉水华溪蟹和克氏原螯虾为实验对象，将RAPD技术引入到甲壳类研究中**，以揭示它们的遗传差异，分析遗传多样性。

1 材料与方法

1.1 实验材料 中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*，简写为Es)，购于安徽安庆及湖北保安湖。日本绒螯蟹合浦亚种(*Eriocheir japonicus hepuensis*，简写为Ejh)，购于广西合浦。汉水华溪蟹(*Sinopotamon lansii*，简写为Sl)和克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*，简写为Pc)，

* 本文获淡水生态与生物技术国家重点实验室、淡水鱼类种质资源与生物技术国家重点实验室的资助。

** Lu R, Xiang C. The study of random amplified polymorphic DNA(1): DNA polymorphisms of decapod. The abstracts of 5th international symposium on aquaculture genetics(poster). 1994.

1996-05-23收到。1998-04-06修回。

.net

均购于湖北武汉。

1.2 基因组 DNA 的分离 根据 Blin 和 Stafford 方法略加修改[7]，从实验个体的肝脏组织(新鲜或预先乙醇固定)提取 DNA。

1.3 RAPD 扩增反应 含 10mmol / L Tris · HCl(pH8.0)，50mmol / L KCl，2mmol / L $MgCl_2$，0.001% gelatin，0.2μmol / L引物(Operon 产品)，四种核甘酸 dCTP、dGTP、dATP、dTTP (Promega)各为 100μmol/L，30ng 基因组 DNA，1 单位的 Taq 聚合酶(中国科学院遗传研究所)的 25μl混合物置于 PTC-150 PCR扩增仪(MJ公司产品)进行反应。前 3 个循环为：94℃变性 3min，39℃复性 3min，72℃延伸 3min。后 36 个循环为：94℃变性 45s，39℃复性 75s，72℃延伸 100s。

1.4 扩增产物的电泳分析 扩增产物在 1.4% 琼脂糖(Serva)凝胶中电泳，约 1h。采用 TPE 缓冲系统，所用电压为 5V/cm。电泳完毕，经溴化乙锭染色后，置于紫外透射检测仪(上海长兴机械厂)观察并照相记录。

1.5 RAPD 分析的内容 先使用 20 个引物，即 OPN-02，OPN-03，OPN-05，OPN-20，OPO-06，OPO-07，OPO-08，OPO-10，OPO-11，OPO-12，OPO-13，OPO-15，OPO-16，OPO-19，OPU-12，OPU-15，OPU-16，OPU-17，OPU-18，OPU-19，对四个物种 DNA 库(每库 10 个个体)分析。再使用另 20 个引物，即 OPO-16，OPU-01，OPU-02，OPU-03，OPU-05，OPU-06，OPU-07，OPU-08，OPU-09，OPU-10，OPU-11，OPU-12，OPU-13，OPU-14，OPU-15，OPU-16，OPU-17，OPU-18，OPU-19，OPU-20，对两种绒螯蟹 12 个个体的 DNA 分析[1)]。

1.6 数据处理 采用相似率分析公式：$M=2N_{xy}/(N_x + N_y) \times 100\%$，对扩增图谱进行数据处理，其中 N_x和 N_y指个体(或多个个体混合的物种)x 和 y 分别具有的扩增区带数目，N_{xy}指 x 和 y 共有的扩增区带数目。以 1-M值用 UPGMA(unweighted pair group method using arithmetic averages)方法作聚类分析。

2 结果

2.1 扩增结果的总体情况

缺少引物或模板 DNA 的对照，没有扩增出任何区带。同一扩增反应，三次重复操作的结果是一致的(图 1)；从新鲜组织提取的模板扩增结果，与固定组织得到的模板扩增结果是一致的(图 2)。扩增图谱呈现出引物特异性和模板特异性。同一批引物对不同物种 DNA 库的扩增结果明显不同(图 3)。不同绒螯蟹个体的 DNA 扩增，依不同的引物呈现出或多或少的差异(图 4)。扩增区带大小主要分布在 0.3—2.0kb 之间。

2.2 四个物种间的遗传差异

四个物种 DNA 库的扩增结果显示出，随着分类地位的差距由近到远，物种间相似率从 56.1% 递减到 22.3%(表 1)。用 UPGMA 方法作聚类分析得到的树状图上，可见种间至科间以上的遗传差异逐步增大，这与以形态标记为主的分类结果相一致(图 5)。RAPD 技术揭示出日本绒螯蟹合浦亚种与中华绒螯蟹之间一定的多态性差异。

2.3 两种绒螯蟹个体之间的差异

1) 所用引物的序列参见Operon公司说明。

.net



图 1　3 次重复扩增结果的一致性

Fig. 1　Identity of the triplicate amplification

1—3: Es, OPU-12; 4—6: Es, OPO-16; 7—9: Ejh, OPU-10; 10—12: Ejh, OPU-07

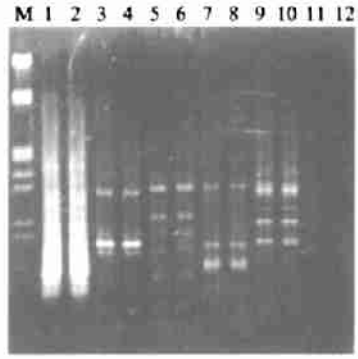


图 2　来自新鲜与固定组织的模板扩增结果

Fig. 2　The same amplifications of DNA from fresh and ethanol-fixed tissues

1, 3, 5: fresh, 新鲜, Es; 2, 4, 6: ethanol-fixed, 固定, Es; 7, 9, 11: fresh, 新鲜, Ejh; 8, 10, 12: ethanol-fixed, 固定, Ejh; 1, 2, 7, 8: OPU-10; 3, 4, 9, 10: OPO-16; 5, 6, 11, 12: OPU-12

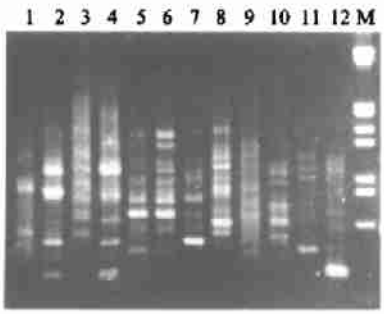


图 3　物种 DNA 库的扩增

Fig. 3　Amplifications of DNA pools

1—4: Es, Ejh, SI and Pc, OPO-16; 5—8: Es, Ejh, SI and Pc, OPO-15; 9—12: Es, Ejh, SI and Pc, OPO-13

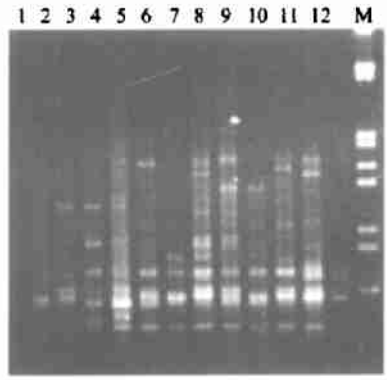


图 4　引物 OPU-10对绒螯蟹个体的扩增

Fig. 4　Amplifications of DNA from individuals of the mitten crabs using primer OPU-10

1—6: Es ♂ 1—3, Es ♀ 1—3; 7—12: Ejh ♂ 1—3, Ejh ♀ 1—3

中华绒螯蟹和日本绒螯蟹合浦亚种的 12 个个体的 DNA 扩增结果揭示，中华绒螯蟹个体间的平均相似率为 56.9%(由 15 个对比算出)(表 2)，日本绒螯蟹合浦亚种个体间则为 66.1%(由 15 个对比算出)(表 3)，两种绒螯蟹个体间的平均相似率为 51.9%(由 36 个对比算出)(表 4)。

经 t 值检验，个体间的平均相似率日本绒螯蟹合浦亚种显著高于中华绒螯蟹($P<0.001$)，异种间则显著低于同种内($P<0.001$)。实验中的 6 个中华绒螯蟹个体具有一些共同区带，为 6 个日本绒螯蟹合浦亚种个体所没有的(图 6)。

.net

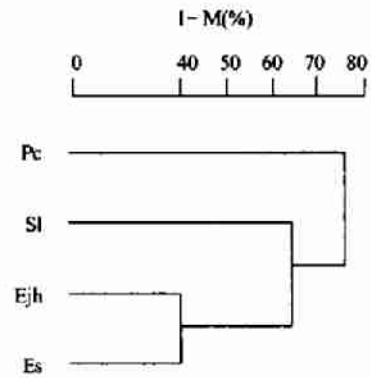


图5 聚类分析构建的树状图

Fig.5 The dendrogram based on a UPGMA analysis

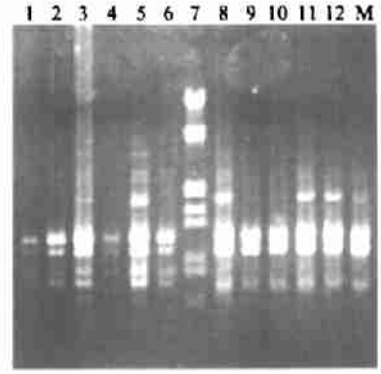


图6 引物 OPU-13得到中华绒螯蟹个体特有区带

Fig.6 Es dividual-specific band with primer OPU-13

1—6: Es ♂ 1—3, Es ♀ 1—3; 7—12: Ejh ♂ 1—3, Ejh ♀ 1—3. M: λ/EcoR I + HindIII

表1 各物种DNA库扩增的区带数目、物种间共有的区带数目及其相似率

Tab.1 The number of bands per species, number of shared bands and percentage similarities between species

扩增区带总数目 The number of bands		共有区带数目(相似率) The number of shared bands (similarity)		
		Sl	Ejh	Es
Pc	150	41(29.7)	34(23.9)	32(22.3)
Sl	126		42(32.3)	39(29.7)
Ejh	134			76(56.1)
Es	137			

表2 中华绒螯蟹个体扩增的区带数目、个体间共有的区带数目及其相似率

Tab.2 The number of bands per ES, number of shared bands and percentage similarities between individuals

扩增区带总数目 The number of bands		共有区带数目(相似率) The number of shared bands (similarity)				
		Es♂2	Es♂3	Es♀1	Es♀2	Es♀3
Es♂1	77	53(60.2)	49(55.7)	44(50.3)	51(54.0)	46(53.8)
Es♂2	99		59(59.6)	51(51.8)	62(58.8)	56(58.0)
Es♂3	99			56(56.9)	65(61.6)	56(58.0)
Es♀1	98				58(55.2)	51(53.1)
Es♀2	112					68(66.0)
Es♀3	84					

3 讨论

RAPD分析的可重复性一直是被关注的问题[8]，随机选择的引物三次重复结果之一致性，表明本研究的RAPD分析是稳定的。来自新鲜组织与乙醇固定组织的DNA扩增一致，说明新鲜组织的乙醇固定不影响RAPD分析的可靠性。因而，为保存组织材料用于

表3　日本绒螯蟹合浦亚种个体扩增的区带数目、个体间共有的区带数目及其相似率

Tab.3　The number of bands per Ejh, number of shared bands and percentage similarities between individuals

扩增区带总数目 The number of bands		共有区带数目(相似率) The number of shared bands (similarity)				
		Ejh♂2	Ejh♂3	Ejh♀1	Ejh♀2	Ejh♀3
Ejh♂1	114	81(73.6)	76(71.0)	80(68.7)	66(63.8)	62(62.9)
Ejh♂2	106		79(76.7)	76(67.6)	63(63.3)	52(55.0)
Ejh♂3	100			78(71.2)	60(62.2)	55(60.1)
Ejh♀1	119				72(67.9)	67(66.3)
Ejh♀2	93					54(61.4)
Ejh♀3	83					

表4　不同种绒螯蟹个体间共有的区带数目及其相似率

Tab.4　The number of shared bands and percentage similarities between individuals of different species of mitten crabs

	共有区带数目(相似率) The number of shared bands (similarity)					
	Ejh♂1	Ejh♂2	Ejh♂3	Ejh♀1	Ejh♀2	Ejh♀3
Es♂1	53(55.5)	50(54.6)	51(57.6)	52(53.1)	43(50.6)	43(53.8)
Es♂2	60(56.3)	56(54.6)	61(61.3)	62(56.9)	50(52.1)	52(57.1)
Es♂3	54(50.7)	52(50.7)	51(51.3)	56(51.4)	43(52.1)	47(51.6)
Es♀1	45(42.5)	47(46.1)	44(44.4)	44(40.6)	43(45.0)	44(48.6)
Es♀2	57(50.4)	57(52.3)	57(53.8)	61(52.8)	48(46.8)	49(50.3)
Es♀3	59(56.7)	51(51.0)	50(51.5)	59(55.4)	48(51.3)	50(56.5)

RAPD分析提供了便利。中华绒螯蟹、日本绒螯蟹合浦亚种、汉水华溪蟹和克氏原螯虾，相互之间分别存在种间、科间、科间以上的关系。物种 DNA 库的扩增结果表明，对应物种间由近至远的分类地位差距，相似率 M 值逐渐减小，表明 DNA 的遗传差异逐渐增大。以1-M值用聚类分析得到的系统树图，与以形态标记为主的分类结果相一致。这初步说明RAPD分析可以同时揭示从种间至科间以上关系相对应的遗传差异。中华绒螯蟹与日本绒螯蟹合浦亚种形态极为相似，没有显著的同工酶多态性差异。但是，RAPD分析从 DNA 水平观察到两种绒螯蟹个体间的一定差异，因而表现出其对研究绒螯蟹群体的潜力。日本绒螯蟹合浦亚种个体间的平均相似率显著高于中华绒螯蟹个体间的，可能是因为中华绒螯蟹分布于更广泛的地区，它的不同群体多少因商业行为而混杂的缘故。

文中全部的中华绒螯蟹个体，出现了为日本绒螯蟹合浦亚种个体所没有的扩增区带。这意味着，在使用更多的引物分析更多的样本，可以获得各自的 RAPD 特异标记，用于两种绒螯蟹的鉴别和保护。

参　考　文　献

[1] Williams J G K et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.*, 1990, **18**(22):6531—6535

[2] Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.*,

.net

1990, **18**(24):7213—7218

[3] Li G et al. Morphometric and biochemical genetic variation of the mitten crab, *Eriocheir*, in southern China. *Aquaculture*, 1993, **111**:103—115

[4] Zhang J, Lu R. A comparison between two kinds of mitten crabs on annual variation of H-EST isozyme. *Aquaculture*, 1993, **111**:322

[5] Nelson K, Hedgecock D. Enzyme polymorphism and adaptive strategy in the decapod Crustacea. *Am. Nat.*, 1980, **116**:238—280

[6] Abele L G. The Biology of Crustacea. Embryology, Morphology, and Genetics. New York: Academic Press, 1982:284—403

[7] Sambrook J, et al. Molecular cloning: a laboratory manual (2nd ed). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989:9.16

[8] Devos K M, Gale M D, The use of random amplified polymorphic DNA markers in wheat. *Theor. Appl. Genet.*, 1992, **84**:567-572

[9] 时建伟。池塘养殖河蟹中几个技术问题的浅析,天津水产, 1993, (1):4—5

RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA(RAPD) ANALYSIS OF FOUR SPECIES IN DECAPOD

Xiang Chaomei, Lu Renhou, Xie Hao, Liu Xiangyu and Zhang Jing

(*Institute of Hydrobiology, the Chinese Academy of Sciences, Wuhan* 430072)

Abstract A technique, known as random amplified polymorphic DNA, has been used in this report to analyze DNA polymorphisms in four species of Decapod. The species were *Procambarus clarkii*, *Sinopotamon lansii*, *Eriocheir japonicus hepuensis* and *Eriocheir sinensis*, which have different pairwise distance.

Amplification of DNA pools from four species revealed the similarities among them decreased from 56.1% to 22.3%, as ancestral relationships became more distant, indicating that genome variation increased. The dendrogram based on a UPGMA analysis showed the gradual increase of genetic variation from inter-species to above-family, which was identical to the classic systematics. While little genetic variation between *E. sinensis* and *E. japonicus hepuensis* was found by allozyme electrophoresis, RAPD revealed certain genetic variation between them.

Amplification of DNA from individuals of *E. sinensis* and *E. japonicus hepuensis* displayed the average similarities were 56.9% in *E. sinensis*, 66.1% in *E. japonicus hepuensis*, and 51.9% between two kinds of mitten crabs. The average similarity was significantly higher in *E. japonicus hepuensis* than in *E. Sinensis*, and that between two kinds of mitten crabs was significantly lower than in *E. sinensis* or in *E. japonicus hepuensis*.

Key words RAPD, Decapod, Polymorphism

.net