第 23 卷 第 2 期
1 9 9 9 年 6 月

水 生 生 物 学 报
ACTA HYDROBIOLOGICA SINICA

Vol. 23, No. 2
Jun., 1999

利用 RAPD 技术对三种绒螯蟹亲缘关系的研究

谢 浩 陆仁后 项超美 张 菁 邱 涛

(中国科学院水生生物研究所，武汉 430072)

摘要 采用 RAPD 技术结合一定的形态学研究手段，对中华绒螯蟹、日本绒螯蟹及其合浦亚种进行亲缘关系的研究，为三种绒螯蟹的种及亚种分析提供重要资料。三种绒螯蟹的第四步足前节长宽比值，与其分类标本吻合或基本吻合。用一组引物，对每种各 10 个个体的基因组 DNA 进行扩增，得到一批特异、可重复的扩增图谱；扩增区带的相似率分析表明，中华绒螯蟹与日本绒螯蟹的亲缘关系远，而日本绒螯蟹合浦亚种与日本绒螯蟹近。最后，对文中 RAPD 分析的取样数量及其鉴别标记的可行性等问题作了讨论。

关键词 RAPD，绒螯蟹属，亲缘关系

中华绒螯蟹是我国特有的名贵水产资源，具有极高的经济价值。日本绒螯蟹及其合浦亚种，也是我国南方具有很大开发价值的资源蟹群。

由于日本绒螯蟹和中华绒螯蟹在形态上极其相似，而二者在中国的分布又有交叉，因而曾有人提出，中国南方的日本绒螯蟹与中华绒螯蟹是同种的不同亚种或不同的生态表型群体[1,2]。日本绒螯蟹合浦亚种在形态上介于中华绒螯蟹及日本绒螯蟹之间，但更接近于日本绒螯蟹[3]。故此，有必要从 DNA 分子水平对三者的亲缘关系作进一步研究。

近年来，由于中华绒螯蟹人工养殖区域的扩大，估计已开始导致绒螯蟹不同种或亚种的混杂。从养殖、育种和种质资源保护角度出发，迫切要求对三种绒螯蟹的亲缘关系进行确定，以及提供有效的方法对这些物种进行快速鉴别。

1990 年 Williams 小组[4]和 Welsh 小组[5]首创的 RAPD 技术，是研究基因组多态性的新方法，它从 DNA 水平直接反映遗传物质的差异，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。

为此，选用三种绒螯蟹，即中华绒螯蟹、日本绒螯蟹、日本绒螯蟹合浦亚种作为实验对象，采用 RAPD 技术结合形态学手段，从 DNA 水平揭示三种绒螯蟹的遗传亲缘关系，为绒螯蟹种质资源的鉴别和保护提供研究依据。

国家自然科学基金资助项目和国家"九五"项目
1997-03-24收到；1998-12-12修回

1　材料和方法

1.1　材料采集　中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis* H. Milne-Edwards，简写为 Es)，成蟹，采自湖北武汉。日本绒螯蟹(*E. japonicus* de Haan，简写为 Ej)，成蟹，采自广东澳头。日本绒螯蟹合浦亚种(*E. japonicus hepuensis* Dai，简写为 Ejh)，成蟹，采自广西合浦。

1.2　形态学测量　根据戴爱云[3]及我们过去测量的结果，三种绒螯蟹第四步足的前节长宽之比，具有明显的差异，较容易进行定量研究。三种绒螯蟹样品各取一定数量的个体，测定其第四步足前节的长度(L)和宽度(W)，计算比值 B(= L/W)，从而进行定量分析。

1.3　模板的制备　取出每个个体的新鲜肝胰脏组织，分别用 70% 的酒精固定，4℃ 保存待用(一般不超过三个月)。根据 Blin 和 Stafford 方法略加修改[6]，将固定组织于约 10 倍体积的裂解液(10mmol/L Tris · Cl，0.1mol/L EDTA，pH8.0；0.5% SDS)中匀浆；加入蛋白酶 K(EMARK)至终浓度为 100μg/ml，50℃ 保温 3h；加等体积的饱和平衡酚抽提三次；乙醇沉淀 DNA，最后加入 TE(pH8.0)溶解。

1.4　RAPD 扩增　根据 Williams 等[4]方法稍作改动。扩增反应的总体积为 25μl，其中包括：10mmol/L Tris-Cl (pH8.0)，50mmol/L KCl，2mmol/L $MgCl_2$，0.001% gelatin，0.2μmol/L 引物(OPERON kit O)，四种核苷酸 dCTP、dGTP、dATP、dTTP 各 0.1mmol/L，30ng 基因组 DNA，1u 的 Taq 酶(华美)。于 PCR 扩增仪(MJ-150)上进行 40 个循环，其中前 2 个循环：94℃ 变性 3min，39℃ 复性 3min，72℃ 延伸 3min；后 38 个循环：94℃ 变性 45s，39℃ 复性 75s，72℃ 延伸 100s。最后在 72℃ 保温 10min。扩增产物在 1.4% 琼脂糖凝胶中电泳完毕，经溴化乙锭染色，紫外检测并记录。

1.5　扩增图谱的数据处理　比较三种绒螯蟹的扩增图谱，寻找它们之间的遗传标记，并通过增加个体数量和扩增重复次数作进一步的核实和确定。采用相似率公式 $S = 2N_{xy}/(N_x + N_y)$ 处理两个样品区带一致性数据，这里 N_{xy} 指样品 x 和 y 共有的区带数目，N_x 和 N_y 分别指样品 x 和 y 所具有的全部区带数目。比较种(或亚种)内及相互间各相似率的差异显著性。

2　结　　果

2.1　三种绒螯蟹第四步足前节长宽之比

对三种绒螯蟹各取一定数量的个体，得到第四步足前节的长宽之比结果。经检验遵从正态分布，其平均值及标准差见表 1 所示。

表1　三种绒螯蟹第四步足前节长宽之比平均值及标准差

Tab.1　The average and standard deviation of the ratio of the length to width of the propodus of the fourth leg in three kinds of mitten crabs

	中华绒螯蟹(Es)	日本绒螯蟹合浦亚种(Ejh)	日本绒螯蟹(Ej)
样品数量 n	29	28	27
平均值 $\bar{B}$	2.850	2.484	2.156
标准差 SD	0.220	0.105	0.191

由 t 值检验可见，就第四步足前节长宽之比而言，三种绒螯蟹存在显著的差异

($p<0.001$)；该值依中华绒螯蟹、日本绒螯蟹合浦亚种、日本绒螯蟹的顺序递减，日本绒螯蟹合浦亚种介于中华绒螯蟹与日本绒螯蟹之间.

2.2 RAPD 分析

在每次设定的无 DNA 模板或无引物的对照中，均无区带被扩增出来. 同一扩增反应，重复实验的结果是一致的(图 1).

同一引物对不同模板 DNA，以及不同引物对同一 DNA 样品的扩增图谱均呈现出一定的差异(图 2，图 3). 种内个体间的差异相对较小，种间个体相对较大. 图 3 示引物 OPO-5对三种绒螯蟹个体的扩增中，有一条大小约为 1kb 的区带，为中华绒螯蟹全部个体所特有，而在日本绒螯蟹及其合浦亚种仅个别个体能得到相当微弱的区带. 作者检测 25 个中华绒螯蟹个体，27 个日本绒螯蟹个体及 12 个日本绒螯蟹合浦亚种个体，也证实了这一结果.

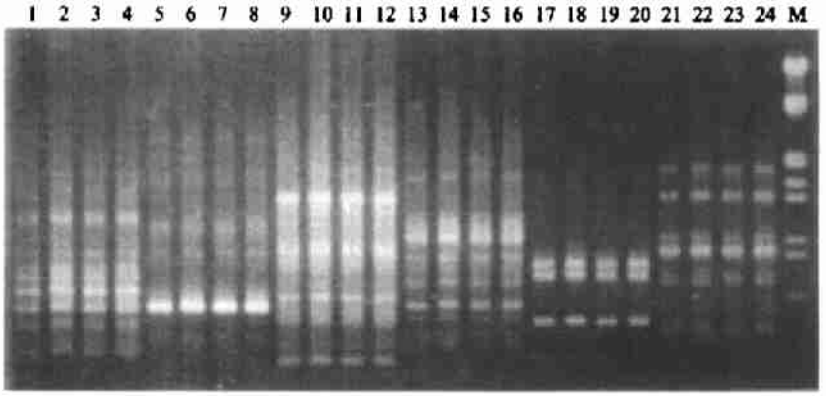


图 1 同一引物对同一个体 DNA 的四次重复扩增

Fig.1 Four amplifications of DNA from the same individuals using same primers

M λDNA (EcoRI /HindIII); 1—4 Esl, OPO-1; 5—8 Es2, OPO-2; 9—12 Ejh1, OPO-7; 13—16 Ejh2, OPO-8; 17-20 Ej1, OPO-18; 21—24 Ej2, OPO-19

1, 5, 9, 13, 17, 21 第一次扩增(1st amplification)；2, 6, 10, 14, 18, 22 第二次扩增(2nd amplification)；3, 7, 11, 15, 19, 23 第三次扩增(3rd amplification)；4, 8, 12, 16, 20, 24 第四次扩增(4th amplification)

在一组引物对不同个体 DNA 的扩增图谱中，三种绒螯蟹种(或亚种)内及相互间扩增区带相似率的最大值、最小值、平均值及标准差见表 2 所示.

表2 三种绒螯蟹种内(亚种内)及种间(亚种间)扩增区带相似率的最大值、最小值、平均值及标准差

Tab.2 The maximum, minimum, average and standard deviation of percentage similarities among intraspecific orcsubspecific individuals and among interspecific orsubspecies ones

	Es	Ejh	Ej	Es-Ejh	Es-Ej	Ejh-Ej
最大值 Max	0.949	0.951	0.987	0.757	0.693	0.821
最小值 Min	0.811	0.836	0.909	0.584	0.558	0.75
平均值 Mean	0.889	0.891	0.942	0.655	0.611	0.778
标准差 SD	0.031	0.018	0.028	0.035	0.028	0.017

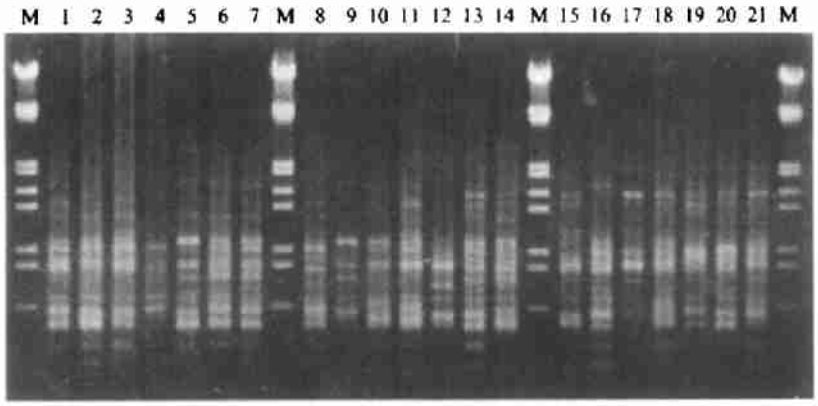


图2　引物OPO-4对Es，Ejh，Ej不同个体的扩增图谱

Fig.2　Amplification of DNA from individuals of Es, Ejh, Ej using primer OPO-4

M λ DNA (EcoR I/HindIII); 1—7 Ej1-Ej7; 8—14 Ejh1-Ejh7; 15—21 Es1-Es7

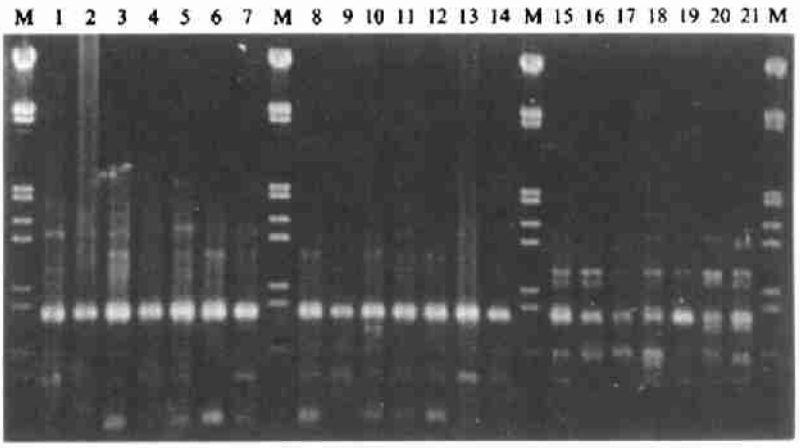


图3　引物OPO-5对Es，Ejh，Ej不同个体的扩增图谱

Fig.3　Amplification of DNA from individuals of Es, Ejh, Ej using primer OPO-5

M　λ DNA (EcoR I/HindIII);　1—7　Ej1-Ej7;　8—14　Ejh1-Ejh7;　15—21　Es1-Es7

对所获得的各相似率数据进行 t 值检测，P 值均 <0.001，表明考察值都存在显著差异。

显然，绒螯蟹种（或亚种）内的个体相似率显著大于种（或亚种）间的个体相似率。由于相似率代表着基因组间的相似程度，因此，三个种（或亚种）间的相似率大小，表明中华绒螯蟹同日本绒螯蟹间的亲缘关系远，而日本绒螯蟹合浦亚种与日本绒螯蟹近。

3　讨　论

3.1　取样样品的典型性

本研究所取材料的第四步足前节长宽之比结果，与戴爱云[3]的研究结果是吻合或基本吻合的，表明所取的标本是具有代表性的物种个体。虽然在中华绒螯蟹上有较小的差别，但这种差别并不影响其与日本绒螯蟹及其合浦亚种的显著差异，可能是由于中华绒螯

蟹分布范围较大，含多个群体，测量个体来自不同的种群所致。

3.2 RAPD 分析的取样数量问题

RAPD 分析需要多少取样量合适，并无确切的答案。作者对三种绒螯蟹作 RAPD 分析，取材较困难，加之费用昂贵，因而更需要明确这一问题。

根据 Tajima[7]的 DNA 序列抽样分布理论，在 DNA 水平上估计群体变异时，假设一个群体的大小(Size)为 N，从中取样样品个体数量为 n，群体每代每个个体 DNA 的突变率为 v，则样品 n 中任意两个个体 DNA 核苷酸差异 k 的平均数 E(k)及偏差 V(k)随取样数量 n 变化的关系由下式给出：

$$E(k) = M,$$

$$V(k) = (2M)/[3(n-1)] + [2M^2(2n+3)]/[9n(n-1)],$$

式中 $M = 4Nv$。

当 n 值升高，σ_k值降低并很快达到渐近值。因此，样品数量 n = 10 与 n = 200 几乎一样有效。这表明，只要样本个体数 n≥10，抽样方差便不会太大。因而对核苷酸位点变异的研究，样品数量 n = 10(甚至 5)就是很有效的了。分子生物学实验的耗费较大，这一抽样理论为我们较精确地探明自然界 DNA 水平的变异并最大限度地控制和节省实验消耗，提供了有力依据。

RAPD 技术所研究的遗传差异，其实质是核苷酸序列的差异，因而上述理论适用于 RAPD 分析。从这一理论出发，三种绒螯蟹各取 10 个个体，可以满足通过 RAPD 分析进行亲缘关系研究的实验要求。

3.3 关于三种绒螯蟹的亲缘关系

戴爱云[1]从中华绒螯蟹和日本绒螯蟹间不存在生殖隔离的现象推测，日本绒螯蟹可能是中华绒螯蟹的一个亚种，而不是一个独立的种。Li 等[2]利用同工酶技术结合形态学手段，对分布于中国珠江流域(广东澳头，盐田和莲花山)和长江流域(江苏昆山)的绒螯蟹进行分析，并根据前人提出的甲壳动物种和群体同工酶相似率分类标准，认为这些地方绒螯蟹的差异，是一种生态表型差异，因此，这些地方的日本绒螯蟹和中华绒螯蟹是属于相同的种；并根据优先权法则(The law of priority)，认为应一并称之为日本绒螯蟹，是日本绒螯蟹的不同生态表型群体。

但从基因表达的产物(同工酶及形态)进行研究，其结果受环境影响较大。并且，高等生物体所包含的约 100,000 个基因仅占整个 DNA 序列的一小部分，而这些基因中只有 15% 被表达，被表达为同工酶的基因，又仅仅是被表达基因的一小部分。即同工酶技术所分析的仅仅是整个基因组的相当小的一部分。所以，我们认为，直接从不同的生态环境取样，根据同工酶和某些形态特征的相似率分析结果，得出不同绒螯蟹的差异为生态表型变异的结论，是需要进一步确证的。利用 RAPD 技术进行基因组研究，从理论上可以覆盖整个基因组，检测出的多态性位点不仅包括表达区域，而且包括非表达区域，因而可以较之更直接全面测定遗传型的变异。

RAPD 研究结果表明，三种绒螯蟹两两之间的差异是显著的，均大于种(或亚种)内差异，说明三种蟹之间存在显著的基因型变异，并非生态表型差异。同时，这些 RAPD 相似率数据也表明，在合浦绒螯蟹形态分类地位更接近日本绒螯蟹这点上，是符合三种蟹遗传

亲缘关系的。

由于尚未建立甲壳动物 RAPD 相似率的分类标准，因此，目前还不能根据 RAPD 分析判别三种绒螯蟹的差异属于种或亚种水平，显然，在通过大量的工作获得甲壳动物的 RAPD 分类标准后是可行的。

3.4 关于 RAPD 鉴别标记的可行性

作者用引物 OPO-05，对 25 个中华绒螯蟹个体、27 个日本绒螯蟹个体及 12 个日本绒螯蟹合浦亚种个体扩增，发现中华绒螯蟹所有个体都能扩增出一条大小约为 1kb 的区带，且相当明显和稳定，而其它两种在相同条件下仅有个别个体能扩增出相当微弱的区带。重复实验也证实了这一结果。因此，可将这一区带作为一个遗传标记，用于鉴别中华绒螯蟹与日本绒螯蟹及其合浦亚种。

对日本绒螯蟹及其合浦亚种个别个体能扩增出微弱区带，有两种可能的解释：

一种解释是，由于种种人为原因（主要是人工养殖规模的增大过程中，中华绒螯蟹的大量引种）可导致三种绒螯蟹种间发生基因交流，从而造成日本绒螯蟹及其合浦亚种的个别个体能扩增出中华绒螯蟹的特征区带。

另一种解释是，在日本绒螯蟹及其合浦亚种个别个体扩增出的微弱区带，只是同中华绒螯蟹的特征区带大小相近，但序列并无同源性。

属于何种情况，需要进一步的工作（测序，杂交等）加以证实。

参　考　文　献

[1] 戴爱云. 绒螯蟹属支序分类学的初步分析（甲壳总纲：十足目）. 动物分类学报，1988，**13**(1)：22—26

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

[3] 戴爱云. 绒螯蟹属亚种分化的研究（十足目：短尾派）. 系统进化动物学论文集，1991，61—71

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

[5] Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, 1990, **18**(24):7213—7218

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

[7] Tajima F. Evolutionary Relationship of DNA Sequences in Finite Populations. *Genetics*, 1983, **105**:437—460

STUDIES ON THE RELATIONSHIP OF THREE KINDS OF MITTEN CRABS USING RAPD TECHNIQUE

Xie Hao, Lu Renhou, Xiang Chaomei, Zhang Jing and Qiu Tao

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

Abstract The RAPD technique, together with the method of morphology, was used to study the genetic relationship among three kinds of important mitten crabs: *Eriocheir sinensis*, *E. japonicus* and *E. japonicus hepuensis*. The ratios of the length to width of the propodus of the fourth leg in the three kinds of mitten crabs were identical or near to those of taxonomic samples. In RAPD amplification for 10 individuals of every kind of mitten crabs, specific, reproducible bands were yielded. The similarities among the three kinds of crabs showed that the relationship between *E. sinensis* and *E. japonicus* is the most distant, and that of *E. japonicus hepuensis* and *E. japonicus* is the closest. The sample size of RAPD analysis and the feasibility of RAPD marker for *Eriocheir* differentiation were discussed.

Key words RAPD, *Eriocheir*, Relationship