

不同水系中华绒螯蟹线粒体 *CO I* 基因片段的 RFLP 分析

王晓梅¹, 邢克智¹, 戴伟¹, 王茜¹, 曹维维¹, 李晓东²

(1. 天津农学院 水产科学系 天津市水产生态及养殖重点实验室, 天津 300384;

2. 盘锦光和水产有限公司, 辽宁 盘锦 124200)

摘要:应用 PCR-RFLP 技术分析了长江、瓯江和辽河 3 个水系中华绒螯蟹的线粒体 *CO I* 的基因片段遗传多样性, 应用 11 种限制性内切酶对 *CO I* 基因片段进行限制性片段长度多态分析, 共检测出 6 种复合单倍型, 其中瓯江群体检测出 5 种复合单倍型, 长江和辽河均有 2 种复合单倍型。经数理统计分析, 3 个群体内线粒体 DNA 的核苷酸多样性指数分别为 0.006 7 (长江)、0.016 7 (瓯江) 和 0.000 3 (辽河), 瓯江群体的遗传多态度最高, 其次为长江群体, 而辽河群体在 3 个群体中遗传多态度最低。结果说明, 中华绒螯蟹具有一定群体内遗传多样性: 瓯江群体 > 长江群体 > 辽河群体。在群体间, 辽河与瓯江群体的净遗传距离最大为 0.023 7, 长江与瓯江群体间的净遗传距离次之为 0.020 7, 而长江与辽河群体间的净遗传距离最小为 0.004 3, 说明 3 个种群中长江与瓯江种群间的亲缘关系最近, 而辽河与瓯江种群间的亲缘关系最远。

关键词: 中华绒螯蟹; 线粒体细胞色素氧化酶亚单位 I 基因; 限制性片段长度多态性; 遗传多样性

中图分类号: S932.5+2 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2007)01-0078-05

RFLP Analysis on Mitochondrial Cytochrome Oxidase I Gene of Chinese Mitten Crab (*E. sinensis*)

WANG Xiao-mei¹, XING Ke-zhi¹, DAI Wei¹, WANG Qian¹, CAO Wei-wei¹, LI Xiao-dong²

(1. Tianjin Key laboratory of Aquaculture Ecology and Aquaculture, Department of Fisheries Science,

Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384, China;

2. Panjin Guanghe Fisheries Company of Limited, Panjin 124200, China)

Abstract: The fragments of mitochondrial cytochrome oxidase I of *Eriocheir sinensis* from Changjiang, Oujiang and Liaohe were amplified by using PCR-RFLP technique. 11 restriction endonucleases were used to digest the PCR products. In this study there were 6 composite haplotypes in the 3 populations, there were 5 composite haplotypes in Oujiang population and 2 ones in population of Liaohe and Changjiang. The index of nucleotide diversity (π value) were 0.016 7 (Oujiang), 0.006 7 (Changjiang) and 0.000 3 (Liaohe) respectively, indicating that the genetic diversity of Oujiang population was highest among the 3 populations, the genetic diversity of Changjiang population was higher than that of Liaohe population. Interpopulation net genetic distance was the highest (0.023 7) between Liaohe and Oujiang, while it was 0.020 7 between Changjiang and Oujiang and was 0.004 3 between Changjiang and Liaohe samples. The results indicated that the relationship between the populations from Changjiang and Oujiang was the closest, and that of Liaohe and Oujiang populations was the most distant.

Key words: *Eriocheir sinensis*; Mitochondrial cytochrome oxidase I; RFLP; Genetic diversity

中华绒螯蟹 (*E. sinensis*) 隶属于节肢动物门 (Arthropoda)、甲壳纲 (Crustacea)、十足目 (Decapoda)、

方蟹科 (Grapsidae)、绒螯蟹属 (*Eriocheir*)。中华绒螯蟹俗称河蟹, 是我国重要的经济甲壳动物和水产养

收稿日期: 2006-04-20

基金项目: 天津市应用基础研究重点基金及国际合作基金项目 (033803511; 033803511G); 天津市高等教育科技发展基金项目 (2004BA31)

作者简介: 王晓梅 (1962-), 女, 天津市人, 教授, 主要从事水产动物分子系统学和遗传育种的研究。

殖对象,在我国自然分布广泛,但主要分布于长江、辽河以及瓯江流域,分布于这些水域的河蟹分别被称之为长江蟹、辽河蟹和瓯江蟹,它们既非不同的种,也非亚种,而是不同的地理种群,并且在生理、生长性状等方面存在一定的差异^[1-4]。自 20 世纪 80 年代后期,河蟹的人工养殖和苗种培育迅猛发展,出现了中华绒螯蟹盲目的人工移殖,已造成各水系绒螯蟹种质资源的混杂和性状衰退。鉴于此,为使中华绒螯蟹宝贵物种资源的可持续利用,必须加强对其实遗传概貌研究,分析其遗传多样性,以便进行种质资源的保护以及合理开发和利用。

对于不同水系中华绒螯蟹的遗传学研究在形态学性状^[5, 6]、同工酶酶谱^[7, 8]和 DNA 水平均有报道^[9-12],但这些研究侧重分析了不同水系间中华绒螯蟹的遗传差异、寻找区分不同水系种群的特异遗传标记以及中华绒螯蟹的系统发育过程。而本研究利用 mtDNA 的优势,应用 PCR-RFLP 的方法,通过对中华绒螯蟹线粒体 *CO I* 基因片段的 RFLP 分析,探讨了辽河蟹、长江蟹和瓯江蟹种群间的遗传差异,分析了 3 个种群内的遗传多态性,该研究旨在了解中华绒螯蟹种群的遗传结构特点,为中华绒螯蟹生物多样性的评价积累宝贵的基础数据,为应用分子生物学技术辅助培育出适应不同地区河蟹品种提供可能。

1 材料和方法

1.1 材料

中华绒螯蟹样本采自江苏省南京(长江)、浙江省温州(瓯江)、辽宁省盘锦(辽河),长江群体、瓯江群体、辽河群体分别分析了 33, 15 和 33 个个体。

1.2 总体 DNA 提取及线粒体 *CO I* 基因片段的 PCR 扩增

称取 50 mg 新鲜的肌肉组织,应用 SDS 法^[13]提取样本的总体 DNA。线粒体 *CO I* 基因片段扩增所用引物依据 Folmer^[14]报道的序列,由上海生工生物工程有限公司合成,PCR 反应在美国 MJ 公司 PTG-200TM 扩增仪上进行。反应总体积为 50 μ L,包括 1 \times PCR 反应缓冲液,2.0 mmol/L Mg^{2+} ,200 μ mol/L dNTP,引物各 0.4 μ mol/L,3 U TaqDNA 聚合酶以及模板 DNA 50~100 ng。PCR 循环为:94 $^{\circ}$ C 变性 4 min,94 $^{\circ}$ C 1 min,53 $^{\circ}$ C 1.5 min,72 $^{\circ}$ C 1.5 min,30 个循环,最后在 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。扩增产物经 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测后用于 RFLP 分析。

1.3 线粒体 *CO I* 基因的限制性片段长度多态性分析

应用 11 种限制性内切酶,即: *Alu I*, *Dpn II*, *Hae III*, *Msp I*, *Mse I*, *Rsa I* (New England Biolabs, Ltd), *Taq I*, *Tas I*, *Apa I*, *Nde I* 和 *Vsp I* (NEB 和 Fermentas, Inc.) 消化线粒体 *CO I* 基因片段(酶切反应依据产品说明书进行),检测其限制性片段长度多态性。酶切产物经 2% 的琼脂糖凝胶电泳分离(5 V/cm 恒压),EB 染色,凝胶成像系统(英国 SYNGENE 公司,GENEGENIUS 型)观察并拍照。

1.4 数据处理

依据 Nei 等^[15-17]的数据分析方法,对试验结果进行数理统计分析。首先根据限制性酶切图谱计算各限制性类型(单倍型)间的片段相似系数 F_{xy} 。

$F_{xy} = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$ 其中, N_{xy} 是 x, y 两类型间共有的酶切片段数, N_x, N_y 分别是 x, y 类型的片段总数。各单倍型间的遗传距离计算公式如下:

$$G = \frac{\sum_k \bar{N}_{krk} \bar{G}_{xy}(k)}{\sum_k \bar{N}_{krk}}$$

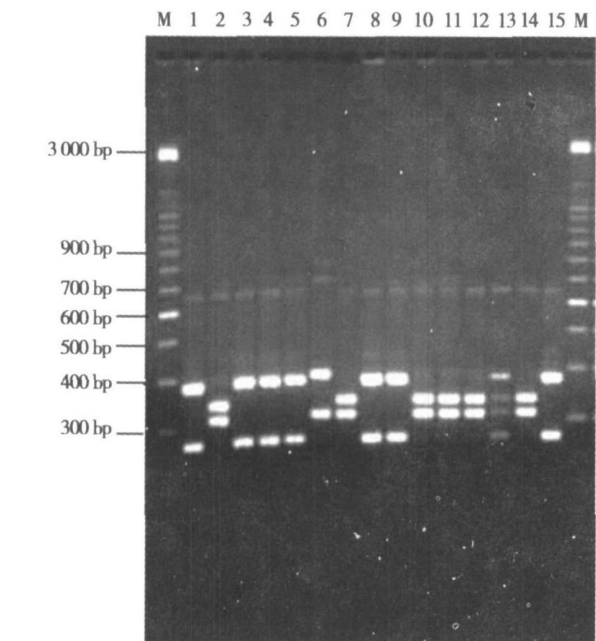
其中 $\bar{G}_{xy}(k) = 1 - \{[(F_{xy}^2 + 8 F_{xy})^{1/2} - F_{xy}] / 2\}^{1/r}$, $\bar{N}_{k} = (N_{x(k)} + N_{y(k)}) / 2$, k 表示所用的第 k 种限制性内切酶类型。根据各单倍型间的遗传距离,计算群体内线粒体 DNA 多态度(或称核苷酸多样性指数) π_A 值: $\pi_A = \sum A_x A_y G_{xy}$ 其中, A_x 是第 x 种限制性类型在群体中所占的比例, A_y 是第 y 种限制性类型所占的比例, G_{xy} 是 x, y 两类型间的遗传距离。

任意两群体 A、B 间的平均线粒体 DNA 多态度 π_{AB} 值为: $\pi_{AB} = \sum A_x B_y G_{xy}$ 。

其中 A_x 和 B_y 分别是第 x 和 y 类型在 A 群体和 B 群体所占的百分数。依据 π_A 、 π_B 和 π_{AB} 可得出任意两个群体间的净遗传距离 P_{net} , $P_{net} = \pi_{AB} - (\pi_A + \pi_B) / 2$ 。

2 结果与分析

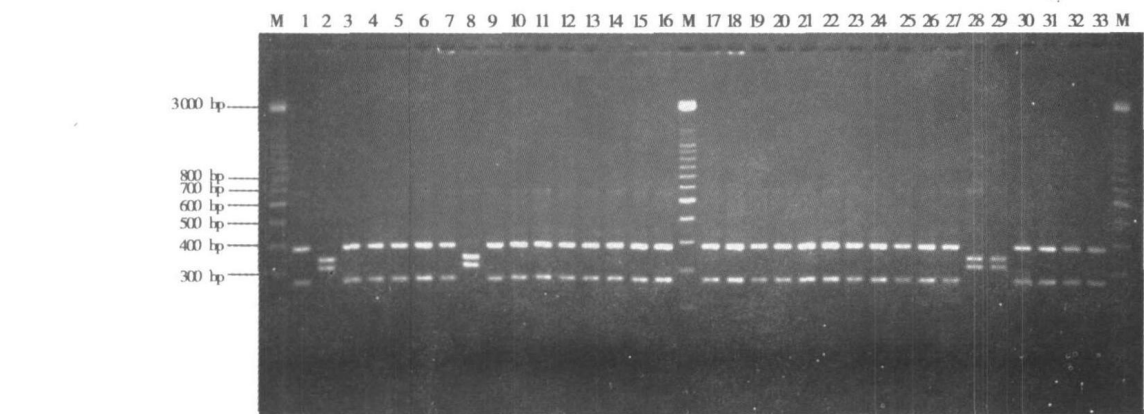
线粒体 *CO I* 基因片段 RFLP 和单倍型分析的结果表明,扩增的样本线粒体 *CO I* 基因片段约为 700 bp,用 11 种限制性内切酶对扩增后的线粒体 *CO I* 基因片段进行酶切,图 1~3 显示了瓯江、辽河以及长江水系的中华绒螯蟹线粒体 *CO I* 基因片段被限制性内切酶 *Msp I* 酶切后的电泳图。依据线粒体 *CO I* 基因片段的 RFLP 图谱,统计了样本的线粒体 *CO I* 基因被 11 种限制性内切酶酶切后的限制性酶切类型,即单倍型的类型,表 1 显示了统计后研究样本的复合单倍型,表 2 为群体内的遗传多态度 π 以及群体间的净遗传距离 P_{net} 。



M. 100 bp DNA 分子量标记;泳道 1, 3~ 5, 8, 9, 15. 单倍型 A;
2, 7, 10~ 12, 14. 单倍型 B; 6 单倍型 C; 13. 单倍型 D
M. 100 bp DNA Ladder; lane 1, 3~ 5, 8, 9, 15. Haplotype A;
2, 7, 10~ 12, 14. Haplotype B; 6. Haplotype C; 13. Haplotype D

图 1 中华绒螯蟹(温州,瓯江水系)线粒体 CO I 基因片段被 Msp I 酶切后的电泳图

Fig 1 Electrophoretic patterns of mitochondrial CO I digested with Msp I on *E. sinensis* from Oujiang River



M. 100 bp DNA 分子量标记;泳道 1, 3~ 7, 9~ 27, 30~ 33. 单倍型 A; 2, 8, 28, 29 单倍型 B
M. 100 bp DNA Ladder; lane 1, 3~ 7, 9~ 27, 30~ 33 Haplotype A; 2, 8, 28, 29 Haplotype B

图 2 中华绒螯蟹(南京,长江水系)线粒体 COI 基因片段被 Msp I 酶切后的电泳图

Fig 2 Electrophoretic patterns of mitochondrial CO I digested with Msp I on *E. sinensis* from Changjiang River

3 讨论

3.1 长江、辽河和瓯江中华绒螯蟹种群的遗传多样性

遗传多样性是指种内不同群体之间或同一群体
内不同个体遗传变异的总和^[18]。遗传多样性包括
分子、细胞和个体 3 个水平,是生命进化和物种分化
的基础,而利用 mtDNA 研究动植物的遗传多样性已

表 1 多个水系绒螯蟹线粒体 CO I 基因限制性
酶切类型(单倍型)

Tab. 1 RFLP haplotype of mitochondrial CO I gene of <i>E. sinensis</i>			
样本来源 Source of Samples	个体编号 Code	复合单倍型 Composite Haplotype	百分比/% Percentage
南京(长江水系)	2, 8, 28, 29	IV	12.0
	其余个体	I	88.0
温州(瓯江水系)	1, 3, 4, 5, 8, 9, 15	I	46.0
	2	II	7.0
	6	III	7.0
	7, 10, 11, 12, 14	IV	33.0
	13	V	7.0
盘锦(辽河水系)	30, 32	VI	6.0
	其余个体	I	94.0

表 2 3 水系群体内的遗传多态度以及群体间
的净遗传距离(P_{net})

Tab. 2 Intrapopulation index of nucleotide diversity of mtDNA and Interpopulation net genetic distance			
	瓯江群体 Oujiang Population	长江群体 Changjiang Population	辽河群体 Liaohe Population
瓯江群体	0.016 7		
长江群体	0.020 7	0.006 7	
辽河群体	0.023 7	0.004 3	0.000 3

注:对角线内为群体内的遗传多态度,对角线下方为群体间的
净遗传距离。

Note: Intrapopulation index of nucleotide diversity of mtDNA (on diagonal) and Interpopulation net genetic distance (below diagonal)

取得了可喜的成果。群体中 mtDNA 的核苷酸多样
性指数(π 值)是衡量群体多态程度的重要指标, π
值越大,群体的遗传多态程度越高。本研究通过对
线粒体 DNA 中进化速度中等的 CO I 基因片段的
RFLP 分析,探讨了长江、瓯江和辽河 3 个自然群体
的遗传多样性。研究得出:上述 3 个群体 mtDNA 的
核苷酸多样性指数,即 π 值分别为 0.006 7(长江)、
0.016 7(瓯江)和 0.000 3(辽河),说明瓯江群体的遗

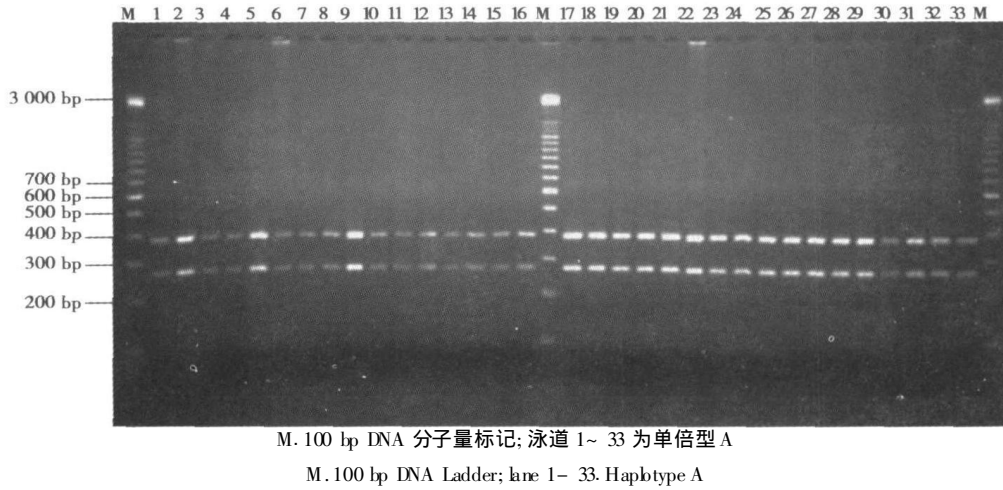


图 3 中华绒螯蟹(盘锦, 辽河水系)线粒体 *CO I* 基因片段 *Msp I* 酶切后的电泳图

Fig 3 Electrophoretic patterns of mitochondrial *CO I* digested with *Msp I* on *E. sinensis* from Liaohe River

传多态度最高, 其次为长江群体, 而辽河群体是 3 个群体中遗传多态度最低的群体。群体的 mtDNA 单倍型的种类是衡量群体遗传多态性的另一个指标, 群体的单倍型种类越多其遗传多样性越丰富。本研究在瓯江群体中检测出 5 种复合单倍型, 辽河和长江群体均各有 2 种复合单倍型, 这一结果也说明中华绒螯蟹群体内的遗传多样性为: 瓯江群体 > 长江群体 > 辽河群体。而通过对三水系中华绒螯蟹核基因组的 RAPD 分析, 邱涛等^[9]认为, 种群内的遗传差异为: 瓯江群体 > 辽河群体 > 长江群体; 高志千等^[10]的研究结果则表明, 中华绒螯蟹群体内的遗传变异为: 瓯江群体 > 辽河群体 > 长江群体; 而李思发等^[11]得出, 中华绒螯蟹的群体内的遗传变异为: 长江群体 > 瓯江群体 > 辽河群体。尽管上述研究显示了不同水系中华绒螯蟹群体内的遗传多样性高低的顺序有所不同, 但均得出一致的结论: 中华绒螯蟹种群内的遗传多样性较低, 与 Nevo 的观点一致^[19]。对于甲壳动物较低的遗传多样性, 可能是由于野生种群缺乏遗传漂变的结果^[20], 过度的捕捞压力及较短的生活史对绒螯蟹属的瓶颈效应也是其遗传多样性偏低的因素之一^[21]。而中华绒螯蟹的遗传多样性较低, 则可能是由于盲目的人工移殖和引种, 使得不同地区的种群基因流动速度过快造成的^[22]。

3.2 长江、辽河和瓯江中华绒螯蟹种群间的亲缘关系

李晨红等^[6]对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中得出: 在长江、瓯江和辽河 3 个种群中瓯江蟹与辽河蟹的亲缘关系较近。赵金良等^[8]对这些样本的生化遗传差异分析中得出: 长江种群与辽河种群间的遗传距离为 0.005, 大于瓯江种群与辽河种群

间的遗传距离 0.001 3, 更大于长江种群与瓯江种群的遗传距离(0.000 9), 说明长江种群与瓯江种群的亲缘关系最近, 瓯江种群与辽河种群的亲缘关系次之, 而 3 个种群中长江种群与辽河种群的亲缘关系最远。李思发等^[11]的 RAPD 分析则得出: 辽河与瓯江种群的遗传距离最大(0.171), 其次为辽河与长江种群间的遗传距离(0.100), 而长江与瓯江种群间的遗传距离最小为 0.095, 说明 3 个种群中长江与瓯江种群间的亲缘关系最近, 长江与辽河种群间的亲缘关系较小, 而辽河与瓯江种群间的亲缘关系最远。本研究通过多样本线粒体 *CO I* 基因片段的 RFLP 分析得出: 辽河与瓯江群体的净遗传距离最大为 0.023 7, 长江与瓯江群体间的净遗传距离次之为 0.020 7, 而长江与辽河群体间的净遗传距离最小为 0.004 3, 这一结果表明: 长江与辽河种群间的亲缘关系最近, 其次为长江与瓯江种群间的亲缘关系, 而辽河与瓯江种群之间的亲缘关系最远。在上述研究中, 长江、瓯江和辽河种群间的亲缘关系远近的顺序有所不同, 这可能与研究的方法以及分析的对象不同有关。

3.3 中华绒螯蟹种质资源保护

中华绒螯蟹是绒螯蟹属中经济价值最高的物种, 是我国重要的水产资源和养殖对象。但是由于近年来养殖业的发展, 盲目的人工移殖和引种, 导致不同水系中华绒螯蟹的混杂和遗传多样性降低, 使中华绒螯蟹种质资源面临退化的危险, 这不仅给生产造成严重的损失, 而且对中华绒螯蟹种质资源的保护十分不利。因此, 必须采取有效的措施保护中华绒螯蟹优良的遗传种质资源, 在管理上应防止外来种群的混入, 影响原有种群的优良生产性状; 同时, 有必要运用多学科的研究手段加强对中华绒螯

蟹种质资源的遗传监测,了解现有资源的基因库和遗传多样性,这是对现有资源进行保护和合理开发利用的前提,而且对河蟹的养殖和培育适合不同地区的河蟹品种也十分必要。此外,有学者^[23]建议,为加强中华绒螯蟹遗传多样性的保护,可建立不同水系河蟹种质资源保护区,实行河蟹良种生产许可证制度,研究制定各水系河蟹品系长期选育方法等,并通过行政、法律和科研的共同努力,使不同水系的中华绒螯蟹的种质资源得到挽救、保护和持续地开发与利用。

参考文献:

- [1] 谷孝鸿,赵福顺.长江中华绒螯蟹的资源与养殖现状及其种植保护[J].湖泊科学,2001,13(3):267–271.
- [2] 万全.瓯江蟹的生产性能及评价[J].淡水渔业,1997,27(2):44–47.
- [3] 羊茜,占家智.辽河蟹和长江蟹生长速度的对比实验[J].淡水渔业,1999,29(10):40–42.
- [4] 赵乃刚.长江河蟹种植资源混杂对养蟹业的影响[J].内陆水产,1998,5:2–4.
- [5] 许加武,任明荣,李思发.长江、辽河、瓯江中华绒螯蟹种群的形态判别[J].水产学报,1997,21(3):269–274.
- [6] 李晨虹,李思发.中国大陆沿海6水系绒螯蟹(中华绒螯蟹和日本绒螯蟹)群体亲缘关系:形态判别分析[J].水产学报,1999,23(4):337–342.
- [7] 王丹,于伟君.辽河、长江两水系中华绒螯蟹脂酶和乳酸脱氢酶的同工酶比较研究[J].辽宁大学学报,1995,22(4):79–81.
- [8] 赵金良,李思发.中国大陆沿海6水系绒螯蟹(中华绒螯蟹和日本绒螯蟹)群体亲缘关系:生化遗传差异分析[J].水产学报,1999,23(4):331–336.
- [9] 邱涛,陆仁后,项美超,等. RAPD 方法对中华绒螯蟹长江、辽河、瓯江三群体的遗传多样性分析[J].淡水渔业,1997,27(5):3–6.
- [10] 高志千,周开亚.中华绒螯蟹遗传变异的 RAPD 分析[J].生物多样性,1998,6(3):186–190.
- [11] 李思发,邹曙明.中国大陆沿海6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.
- [12] Boping Tang, Kaiya Zhou, Daxiang Song, *et al.*, and Aiyun Dai. Molecular systematics of the Asian mitten crabs, genus *Eriocheir* (Crustacea: Brachyura) [J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2003, 29: 309–316.
- [13] 王晓梅,宋文芹,陈瑞阳,等.用 RAPD 技术检测野生鲫鱼和四个金鱼代表品种的基因组 DNA 多态性[J].遗传,1998,20(5):7–11.
- [14] Folmer O, Black M, Hoeh W, *et al.* DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates[J]. Molecular Marine Biology and Biotechnology, 1994, 3(5): 294–299.
- [15] Nei M, Li W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases [J]. PNAS, 1979, 76(10): 5269–5273.
- [16] Nei M, Tajima F. DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases[J]. Genetics, 1981, 97(1): 145–163.
- [17] Nei M, Miller J C A. A simple method for estimating average number of nucleotide substitution within and between populations from restriction data [J]. Genetics, 1990, 125: 873–879.
- [18] 庞广昌,郭冬梅.群体遗传多样性和数据分析[J].林业科学,1995,31(6):543–550.
- [19] Nevo E, Beiles A, Ben Shlomo R. The evolutionary significance of genetic diversity: ecological, demographic and life history correlates // Mani G Sed. Evolutionary Dynamics of Genetic Diversity[M]. Berlin: Springer-Verlag, 1984: 13–213.
- [20] Nelson K, Hedgecock D. Enzyme polymorphism and adaptive strategy in the Decapod Crustacea [J]. Amer Nat, 1980, 116(2): 228–279.
- [21] Sbordoni V, Matthaes E, Cobdli S. Bottleneck effects and the depression of genetic variability in hatchery stocks of *Penaeus japonicus* (Crustacea: Decapoda) [J]. Aquaculture, 1986, 57: 239–251.
- [22] 邱高峰,徐巧婷,王丽卿,等.四种绒螯蟹分子分类与系统发育[J].动物学报,2001,47(6):640–647.
- [23] 钱银龙.我国中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis* H. milne Edwards)资源和养殖生产管理现状及发展建议[J].现代渔业信息,1998,13(2):12–17.