

文章编号: 1004 - 7271(2008)04 - 0385 - 05

中华绒螯蟹长江天然群体遗传差异的 AFLP 初步分析

黄 雷, 王成辉, 李思发

(上海海洋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:应用 AFLP 分子标记,对不同年代和地点采集的长江中华绒螯蟹天然样本(1998 年江苏镇江江段, 2005 年和 2006 年江苏南京江段,2004 年、2005 年及 2006 年长江口)的遗传变异进行了初步分析。结果发现:六个采集样本在等位基因平均数、有效等位基因数、Nei's 基因多样性指数、Shannon 信息指数等 4 项遗传多样性指标方面均未出现显著差异($P > 0.05$),但长江口 3 个采集样本的这 4 个指标都略高于长江干流的 3 个采集样本;AMOVA 分析显示,样本间的遗传变异仅为 3.89%,而样本内的遗传差异却高达 96.11%;UMPGA 树分析显示,2004 - 2006 采集样本与 1998 年采集样本之间有一定的遗传差异。研究结果初步表明,不同年代与地点的长江中华绒螯蟹天然群体的遗传变异没有出现显著分化;同 20 世纪 90 年代末的样本相比,本世纪初的样本产生了一定程度的遗传差异,但未达显著水平。

关键词:中华绒螯蟹; AFLP; 遗传变异

中图分类号: S 917 文献标识码: A

Preliminary study on genetic variability in Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) from the Yangtze river by AFLP marker

HUANG Lei, WANG Cheng-hui, LI Si-fa

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

Abstract: AFLP marker was used to evaluate the current genetic variability of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) from the Yangtze River. Six samplings of Chinese mitten crab were sampled in different locations of the Yangtze River and different years (Zhenjiang section in 1998, Nanjing section in 2005 and 2006, the Yangtze River estuary in 2004, 2005 and 2006). The results indicated that: there were no significant differences in mean allele numbers (N_a), effective allele numbers (N_e), Nei's diversity indexes (H) and Shannon information indexes (I) among six samplings ($P > 0.05$). AMOVA analysis showed that 3.89% of the total variation were among samplings, and 96.11% were contributed within samplings. UMPGA tree showed some genetic divergence between 2004 - 2006 samplings and 1998 samplings. It was preliminarily indicated that there was no significant genetic variability from wild population of the Chinese mitten crab in

收稿日期: 2007-11-08

基金项目: 上海市科委重大科技攻关项目(04DZ19306); 上海市农委科技兴农重点攻关项目(沪农科攻字 2004 第 8-7 号); 上海市重点学科建设项目(Y1101)

作者简介: 黄 雷(1982-), 男, 山东济宁人, 硕士研究生, 专业方向为水产动物种质资源与种苗工程。

通讯作者: 李思发, Tel: 021-65710333, E-mail: sfli@shou.edu.cn

different locations of the Yangtze River and different years, and there were some genetic divergences between the samplings in 2004 – 2005 and the samplings in 1998, but these genetic divergences had not reached a significant level.

Key words: *Eriocheir sinensis*; amplified fragment length polymorphism (AFLP); genetic variability

中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 在我国广泛分布于辽河、黄河、长江、瓯江和闽江等江河流域, 是我国最主要的经济蟹类之一。在各水系中华绒螯蟹中, 长江水系中华绒螯蟹资源最为丰富, 一直是我国河蟹增养殖业的最主要苗种来源。同时, 长江流域的河蟹产量占我国河蟹总产量的 90% 以上。可以说长江水系的河蟹种质资源状况是我国整个河蟹产业的命脉和保障。但是近 10 余年来, 由于受过度捕捞和人类活动的干扰和破坏, 长江的中华绒螯蟹自然资源急剧衰退, 尤其在 2002-2003 年份, 长江口的蟹苗捕捞量只有几公斤^[1]。由于河蟹一生中只繁殖一次, 即从蟹苗经过两年的生长达性成熟时只繁殖一次后就死亡, 不同年度间繁殖的河蟹不会发生生殖交流。本文于 2004-2006 年从长江干流和长江口采集了部分中华绒螯蟹成蟹样本, 并与 20 世纪 90 年代末在长江干流中采集的成蟹样本相比较, 应用扩增片段长度多态性 AFLP (amplified fragment length polymorphism) 分子标记来分析长江中华绒螯蟹天然群体的遗传变异程度和水平, 以期了解当前长江内中华绒螯蟹的种质资源现状, 为中华绒螯蟹种质资源的管理、保护和合理开发提供相关依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

中华绒螯蟹样本于 1998 年采自长江镇江江段, 2005 年和 2006 年采自江苏南京江段, 2004、2005 年及 2006 年采自长江口九段沙水域。95% 酒精保存固定备用 (表 1)。实验用的引物、人工接头由上海生物工程公司合成。

表 1 中华绒螯蟹样本采集的时间和地点

Tab. 1 The sampling locations, dates and numbers of *Eriocheir sinensis*

采样地点	1998 江苏镇江 (1998YZ)	2005 江苏南京 (2005YZ)	2006 江苏南京 (2006YZ)	2004 长江口九段沙 (2004JDS)	2005 长江口九段沙 (2005JDS)	2006 长江口九段沙 (2006JDS)
采样时间	1998 年 10 月	2005 年 10 月	2006 年 10 月	2004 年 12 月	2005 年 12 月	2006 年 12 月
本实验用样本数 (只)	15	15	15	15	15	15

1.2 DNA 的提取

基因组 DNA 提取参照李思发等^[2]描述的方法。

1.3 AFLP 分析

实验方法参照 Vos^[3]的方法。选用 6 碱基的 EcoR I 和 4 碱基的 Mse I 限制性内切酶, 对分析样本进行酶切、连接、PCR 预扩增和选扩增, 最后聚丙烯酰胺电泳。具体方法如下:

1.3.1 酶切和连接

酶切: 取模板 DNA (100 ng/ μ L) 2 μ L, 加 10 \times buffer2 溶液 2 μ L, BSA (1000 ng/ μ L) 0.2 μ L, EcoR I (20 U/ μ L) 0.5 μ L, Mse I (10 U/ μ L) 0.5 μ L, 然后用去离子灭菌水补足 20 μ L。在 37 $^{\circ}$ C 中保温 4 h 后, 75 $^{\circ}$ C 水浴灭活 15 min, 立即置于冰上 2 min 后离心收集。

连接: 取上述酶切产物 10 μ L, 加 EcoR I 接头 (5 pmol/ μ L) 1 μ L, Mse I 接头 (50 pmol/ μ L) 1 μ L, 10 \times T4 连接酶 buffer 1 μ L, T4 连接酶 (400 U/ μ L) 0.5 μ L, 用去离子灭菌水补足 20 μ L, 16 $^{\circ}$ C 过夜 (至少 12 h)。

1.3.2 PCR 预扩增和选择性扩增

PCR 预扩增:取连接产物 0.5 μL , 加 10 \times buffer 溶液 2.5 μL , dNTP (10mmol/ μL) 0.5 μL , EcoR I 和 Mse I 预扩增引物 (20 pmol/ μL) 0.3 μL , Taq 酶 (2.5 U/ μL) 0.5 μL , 用去离子灭菌水补足 20 μL 。PCR 反应条件为:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,56 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 80 s,25 个循环后,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min;4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。预扩增产物稀释 100 倍,20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

PCR 选择性扩增:取预扩稀释产物 1 μL ,加 2 \times Mix 混合液(包含 Taq 聚合酶、dNTP 和反应 buffer 液)12.5 μL ,EcoR I 选扩引物 (20 pmol/ μL)0.5 μL , Mse I 选扩引物 (20 pmol/ μL)0.5 μL ,用去离子灭菌水补足 25 μL 。PCR 反应条件为:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,65 $^{\circ}\text{C}$ (以后每循环降低 1 $^{\circ}\text{C}$,)退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 80 s,进行 10 个循环,然后 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 sec, 55 $^{\circ}\text{C}$ 30 sec, 72 $^{\circ}\text{C}$ 60 sec,23 个循环。

1.3.3 扩增产物电泳

本实验使用贝克曼库尔特 (Beckman Coulter) 公司 CEQ8000 遗传分析系统进行电泳分析,电泳结果通过软件自动统计分析并转换成“0,1”矩阵。

1.4 数据分析

对于电泳结果的建立原始数据矩阵,利用 POPGENE Version3.2 软件计算多态位点百分率 (PPL)、等位基因平均数 (N_a)、有效等位基因数 (N_e)、Nei's 基因多样性指数 (H),Shannon 信息指数 (I) 以及 Nei 的遗传距离 (D) 和遗传一致度 (I)。用 Arlequin3.01 软件^[4]进行了样本间遗传变异的分子方差分析 (AMOVA),并分析各采集样本的遗传分化指数 F_{ST} 。

2 结果

2.1 AFLP 扩增结果

本实验使用的 6 对引物在中华绒螯蟹六个样本中共扩增出 910 条清晰、稳定的条带,平均每条引物为 151.2 条带,最多的扩增出 207 条带,最少的扩增出 135 条,条带大小在 55 bp ~ 600 bp 之间。图 1 为部分样本用 E1 - M7 引物扩增的图谱(该图是由 CEQ8000 遗传分析系统得到的峰行图经 Genographer6.0 软件转化成的电泳图谱)。

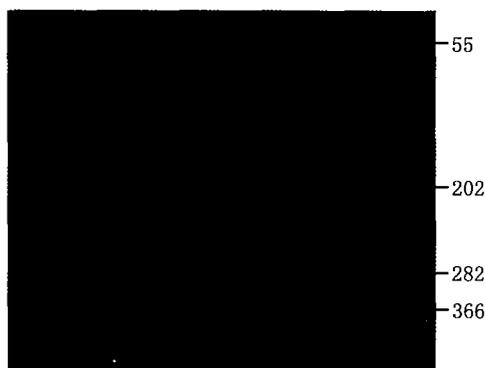


图 1 引物 E1 - M7 对中华绒螯蟹部分样本的 AFLP 扩增电泳检测图谱

Fig. 1 AFLP profiles by primer E1 - M7 in some individuals of six samplings of *Eriocheir sinensis*

2.2 遗传多样性

在 910 个扩增位点中,6 批样本共有多态位点 886 个,占位点总数的 97.36%。在观察等位基因数、有效等位基因数、Nei's 基因多样性和 Shannon 信息指数四项指标,以 2004 年九段沙样本最高。

1998 年镇江样本在观察等位基因数指标上最低,2005 年南京样本在有效等位基因数、Nei's 基因多样性和 Shannon 信息指数等三个指标最低(表 2)。方差分析显示,6 批样本这些指数上均不存在显著差异 ($P > 0.05$)。总体上,长江口九段沙样本的上述四项指标要略高于长江干流中采集的样本。

2.3 遗传相似性和遗传距离

6 批样本中华绒螯蟹的遗传相似度和遗传距离如表 3 所示。样本间的遗传距离为 0.011 0 ~ 0.018 9,2004 年九段沙样本与 2005 年九段沙样本间的遗传距离最小,为 0.011 0;1998 年江苏镇江样本与 2004 年九段沙样本间的遗传距离最大,为 0.018 9。

表 2 中华绒螯蟹 6 批样本的遗传多样性指标

Tab. 2 Genetic diversity indexes in six samplings of *Eriocheir sinensis*

样本	多态位点数	观察等位基因数 (N_a)	有效等位基因数 (N_e)	Nei's 基因多样性 (H)	Shannon 信息指数 (I)
1998 镇江(1998YZ)	484	1.531 9 ± 0.499 3	1.185 4 ± 0.285 3	0.119 2 ± 0.157 4	0.193 6 ± 0.229 8
2005 南京(2005YZ)	502	1.551 6 ± 0.497 6	1.176 9 ± 0.275 7	0.114 9 ± 0.153 5	0.188 7 ± 0.223 9
2006 南京(2006YZ)	510	1.560 4 ± 0.496 6	1.187 6 ± 0.275 3	0.122 6 ± 0.155 1	0.200 4 ± 0.227 4
2004 九段沙(2004YZ)	577	1.634 1 ± 0.482 0	1.204 0 ± 0.277 1	0.134 6 ± 0.154 1	0.221 8 ± 0.224 1
2005 九段沙(2005JDS)	533	1.585 7 ± 0.492 9	1.201 2 ± 0.282 4	0.130 9 ± 0.158 1	0.213 2 ± 0.230 7
2006 九段沙(2006JDS)	547	1.601 1 ± 0.489 9	1.193 8 ± 0.278 6	0.126 6 ± 0.155 5	0.207 9 ± 0.226 0

表 3 6 批样本中华绒螯蟹的遗传相似度(对角线上方)和遗传距离(对角线下方)

Tab. 3 Genetic identity(above diagonal) and genetic distance(below diagonal) in six samplings of *Eriocheir sinensis*

样本	1998 镇江 (1998YZ)	2005 南京 (2005YZ)	2006 南京 (2006YZ)	2004 九段沙 (2004JDS)	2005 九段沙 (2005JDS)	2006 九段沙 (2006JDS)
1998 镇江(1998YZ)	-	0.9822	0.9835	0.9813	0.9832	0.9854
2005 南京(2005YZ)	0.0180	-	0.9883	0.9845	0.9835	0.9831
2006 南京(2006YZ)	0.0166	0.0117	-	0.9870	0.9873	0.9883
2004 九段沙(2004JDS)	0.0189	0.0156	0.0131	-	0.9891	0.9838
2005 九段沙(2005JDS)	0.0169	0.0167	0.0128	0.0110	-	0.9887
2006 九段沙(2006JDS)	0.0174	0.0170	0.0117	0.0113	0.0114	-

2.4 遗传差异的分子方差分析

AMOVA 分析表明,在 6 批样本的总变异量中,样本间差异的贡献率仅为 3.89%,而样本内个体间的差异的贡献率高达 96.11%(表 4)。

表 4 中华绒螯蟹 6 批样本间遗传差异的分子方差分析(AMOVA)

Tab. 4 Analysis of molecular variance(AMOVA) in six samplings of *Eriocheir sinensis*

变异来源	自由度	平方和	方差组分	方差比例(%)
样本间	5	627.056	3.15630	3.89
样本内	84	6557.600	78.06667	96.11
总变异	89	7184.656	81.22296	

2.5 UPGMA 树

依据遗传距离,对 6 个采样样本的 AFLP 数据构建的 UPGMA 系统树(图 2)表明,2004、2005 与 2006 长江口九段沙采样样本聚为一支,2005 与 2006 长江南京江段采样样本聚为另一支,它们再合为一大支;而 1998 年长江镇江江段采样样本单独聚为一支。

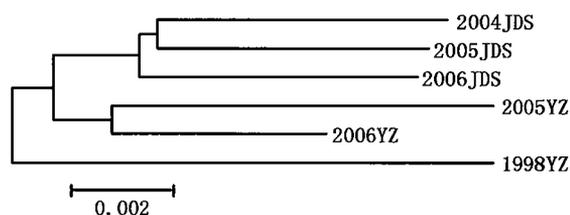


图 2 中华绒螯蟹 6 批采样样本的 UPGMA 树

Fig. 2 The UPGMA tree of six samplings of *Eriocheir sinensis*

3 讨论

根据所分布的地理位置,中华绒螯蟹在我国分为不同的水系群体,如辽河水系、黄河水系、长江水系、瓯江水系和闽江水系等。由于长江流域优异的水域生态条件,长江水系中华绒螯蟹的种质资源最为丰富,最为出名。长江水系中华绒螯蟹的资源状况最令人关注^[5-6]。先前对中华绒螯蟹的种质资源研究,主要是不同水系群体的比较。如邱涛等^[7]和高志

千等^[8]分别利用 RAPD 技术研究了长江、辽河和瓯江水系中华绒螯蟹的种质状况;李思发等^[2]研究我国从北到南六个水系中华绒螯蟹的遗传变异;张凤英等^[9]利用线粒体 12S rDNA 部分序列分析了长江、辽河和瓯江水系中华绒螯蟹的遗传特征。但对长江水系内中华绒螯蟹的种质资源评价和研究却较为贫乏。收集、整理、评价长江水系中华绒螯蟹种质资源,是当前中华绒螯蟹产业发展中较为迫切的研究课题。尤其在经历种质混杂和资源急剧衰退后,开展长江水系中华绒螯蟹的种质资源评价和研究,显得更为重要。

胡鹏飞等^[10]通过对江苏南京和江都地区采集的长江水系中华绒螯蟹的线粒体 COI 基因的 RFLP 分析,发现长江水系中华绒螯蟹具有一定的群体内遗传多样性。本文发现,2004 - 2006 年度不同采样地点(长江干流和长江口)的中华绒螯蟹样本在多个遗传多样性指标(等位基因平均数、有效等位基因数、Nei's 基因多样性指数、Shannon 信息指数等),均不存在显著差异。本研究结果表明,不同年代与地点的长江中华绒螯蟹群体的遗传变异未出现显著分化,而与 20 世纪 90 年代相比,当前长江水系中华绒螯蟹的遗传多样性也未发生显著改变。对于这种状况,可能存在如下二个方面的原因:一是长江中仍具有较大数量的中华绒螯蟹亲蟹群体,长江水系中华绒螯蟹的遗传背景和基因库一直都很丰富,即使在经过近年来资源下降后,仍保持有较高水平的遗传多样性;二是长江水系可能混有其它水系中华绒螯蟹,即通过外来遗传物质的进入,补充了“资源下降后”所造成的遗传多样性丢失。但作者认为第一种可能性较大,因为作者近几年的调查发现,长江中仍有相当数量的亲蟹资源,许多亲蟹不仅个体大(2005 年长江南京江段采集样本的最大个体为 420 g),而且表型优美。但从遗传距离所构建的分子树发现,同 20 世纪 90 年代样本相比,当前样本已产生了一定程度的遗传差异,但是这种差异尚未达到显著水平中。

赵乃刚认为^[11],长江口存在大洄游与小洄游群体,大洄游群体沿长江进行远距离的迁移,而小洄游群体一生中只在长江口进行短距离迁移。本研究 UPGMA 树分析发现,长江口九段沙 2004、2005、2006 年三样本聚为一支,长江干流 2005、2006 年样本聚为一支;但遗传多样性分析表明,2004 - 2006 年长江口采集样本的遗传多样性水平略高于长江干流中的采集样本,这是否与大小洄游群体有关,有待深入研究。

另外,在 AMOVA 分析中发现,样本间的遗传变异很小,而样本内的变异相当大(占总变异的 95% 以上),表明同一样本内的遗传变异和分化较为明显,遗传差异主要来自分析样本内部。因为本次实验分析样本只为长江中亲蟹群体的“沧海一粟”。因而还有待进一步分析与研究,如增加分析样本数等。

参考文献:

- [1] 李思发. 河蟹产业发展的种质问题和对策[J]. 科学养鱼,2006,(6):1-2.
- [2] 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.
- [3] Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting[J]. Nucleic Acids Research, 1995, 23(21):4407-4414.
- [4] Schneider S, Roessli D, Excoffier L. Arlequin: a software for population genetics data analysis. Vers. 2.000. Genetics and Biometry Lab, Dept. of Anthropology[M]. Univ of Geneva, 2000.
- [5] 谷孝鸿,赵福顺. 长江中华绒螯蟹的资源与养殖现状及其种质保护[J]. 湖泊科学,2001,13(3):267-271.
- [6] 施炜纲,周 昕,杜晓燕. 长江中下游中华绒螯蟹亲体资源动态研究[J]. 水生生物学报,2002,26(6):641-647.
- [7] 邱 涛,陆仁后,项超美,等. RAPD 方法对中华绒螯蟹长江、辽河、瓯江群体的遗传多样性研究[J]. 淡水渔业,1997,27(5):1-4.
- [8] 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.
- [9] 张凤英,马凌波. 长江、辽河、瓯江三水系中华绒螯蟹 mt12SrDNA 片段序列的比较[J]. 海洋渔业,2004,26(2):147-151.
- [10] 胡鹏飞,王 茜,戴 伟,等. 长江水系中华绒螯蟹线粒体 DNA 的遗传多样性研究[J]. 水产学杂志,2006,15(1):1-5.
- [11] 赵乃刚. 蟹文化与蟹业[J]. 水产科技情报,2004,31(6):243-246.