

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2019.18259

中华绒螯蟹长江、黄河和辽河水系野生和养殖群体的遗传多样性

苏雨^{1,2}, 张成^{1,2}, 李清清^{1,2}, 郑海地⁴, 成永旭^{1,2,3}, 吴旭干^{1,2,3}

1. 上海海洋大学农业农村部淡水种质资源重点实验室, 上海 201306;
2. 上海海洋大学水产动物遗传育种上海市协同创新中心, 上海 201306;
3. 上海海洋大学水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306;
4. 浙江澳凌水产种业科技有限公司, 浙江 长兴 313106

摘要: 中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)是中国最重要的淡水养殖蟹类, 广泛分布于东亚地区, 养殖区域主要集中在长江、黄河和辽河流域。本研究基于线粒体 DNA D-loop 区评估辽河野生群体(LW)和养殖群体(LC)、黄河野生群体(HW)和养殖群体(HC)及长江野生群体(YW)和养殖群体(YC)的遗传多样性和种群结构。结果显示: (1)用于本研究的 D-loop 基因片段长度为 477 bp, 共包含 234 个变异位点和 131 个简约信息位点, 6 个群体的 262 个个体中共有 110 个单倍型, 包括 90 个独有单倍型和 20 个共享单倍型; (2)6 个种群的单倍型多样性指数(H_d)范围为 0.88889~0.96522, 核苷酸多样性指数(π)范围为 0.00887~0.01602, 养殖和野生群体遗传多样性水平依次为: HC>YC>LC 及 HW>LW>YW; (3)6 个群体的遗传距离(D_a)范围为 0.0119~0.0173, 不论是养殖群体还是野生群体, 辽河群体和长江群体之间的遗传距离均最小, 且 6 个群体间遗传分化指数 F_{ST} 为 0.12938。对 6 个群体进行中性检验显示 Tajima's D 和 Fu's F_s 的值均为负值。综上, 基于线粒体 D-loop 基因的研究结果表明, 三水系养殖和野生群体均具有较高的遗传多样性, 且辽河和长江水系中华绒螯蟹的亲缘关系相对较近, 该研究为中华绒螯蟹的种质资源评估、保护和开发提供了参考。

关键词: 中华绒螯蟹; D-loop; 地理种群; 遗传多样性; 遗传结构

中图分类号: 917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2019)03-0436-09

中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)是中国最重要的淡水经济养殖蟹类, 2016 年养殖产量达到 81.2 万 t^[1]。中华绒螯蟹野生群体自然栖息地主要分布在辽河、黄河、长江和瓯江等水系^[2-3], 养殖区域主要集中在辽河、黄河和长江流域^[4-5]。近些年来随着市场需求量不断增加, 中华绒螯蟹的经济价值也逐渐上升^[6]。由于不同水系的养殖性能和蟹种价格相差较大^[7-8], 一些养殖户为了追求短期利益, 盲目跨区域引种, 这种水系间盲目引种和养殖导致中华绒螯蟹种质混杂和养殖性能退化^[9]。

另外, 中华绒螯蟹的增殖放流虽然取得一定的经济效益和社会效益, 但也导致诸多问题, 使得原有种群间的关系遭到一定的破坏, 急需科学评估其对中华绒螯蟹种群遗传多样性的影响^[4]。虽然先前已有对长江及辽河水系中华绒螯蟹野生种群的遗传多样性状况和种群结构的研究, 但是其大都采用 20 世纪 90 年代和 21 世纪初的样品, 年代较为久远, 以至于无法反映现今的种质资源分布情况^[10-11]。因此, 为有效保护和合理开发各水系中华绒螯蟹种质资源, 亟待系统评估中国主要水

收稿日期: 2018-09-03; 修订日期: 2018-11-18.

基金项目: 现代农业产业技术体系专项资金项目(CARS-48); 上海市科委工程技术中心能力提升项目(16DZ2281200); 上海市教委水产动物遗传育种协同创新中心项目(A1-2041-18-0003); 浙江省湖州市人社局“湖州市南太湖精英计划”(湖精英领 2017-1C); 深圳市澳华农牧有限公司横向项目(D-8006-16-0088).

作者简介: 苏雨(1995-), 女, 硕士研究生, 研究方向甲壳动物营养生理和品质育种. E-mail: suyuishou@163.com

通信作者: 吴旭干, 教授. E-mail: xgwu@shou.edu.cn

野生和养殖群体的遗传多样性、遗传分化和遗传结构。

线粒体具有双层膜结构以及独特的 DNA 分子, 同时也是动物细胞中唯一的具有“染色体外”基因组的半自主性细胞器, 其具有完整的传递与表达遗传信息的能力。由于线粒体基因组结构简单, 某些区域进化速率快, 呈母系遗传, 且不发生重组现象等特点^[12], 线粒体 DNA 已成为评估群体遗传学和生物进化的有效标记^[13]。其中, 线粒体 D-loop 基因作为线粒体基因组上的非编码基因, 是整个线粒体基因组序列和长度变异最高的区域, 同时也是一个有效的分子标记。目前, 虽然基于线粒体基因片段对中华绒螯蟹种群进行遗传评估已有一些报道, 如基于线粒体 16S rDNA 序列对中华绒螯蟹、合浦绒螯蟹(*Eriocheir hepuensis*)和日本绒螯蟹(*Eriocheir japonica*)的系统发生关系进行分析^[14]; 基于线粒体 COI 基因序列等对长江、辽河、瓯江水系野生中华绒螯蟹及其莱茵河水系 F1 群体进行种质评价, 证明当前各水系中华绒螯蟹种质混杂确实存在^[15]; 基于线粒体 COI 和 Cyt b 基因序列研究东亚地区绒螯蟹的地理分布和遗传结构^[16]。但是, 基于线粒体 D-loop 分子标记研究养殖和野生中华绒螯蟹遗传多样性和遗传结构的相关报道相对较少。

本研究基于线粒体 D-loop 区通过比较辽河、黄河和长江水系的中华绒螯蟹养殖和野生群体的遗传多样性和遗传结构, 以期为中华绒螯蟹种质

资源保护、开发利用和遗传选育提供重要的理论依据和现实意义。

1 材料与方法

1.1 样本采集

于 2013 年 10—12 月采集中华绒螯蟹养殖和野生群体, 辽河野生群体(LW)、黄河野生群体(HW)和长江野生群体(YW)分别采集于辽宁盘锦段的辽河、山东东营段黄河和上海崇明段的长江; 辽河养殖群体(LC)、黄河养殖群体(HC)和长江养殖群体(YC)分别采集于各水系附近的中华绒螯蟹养殖场; 每个群体的详细采集地点和数量见表 1。活体剪取附肢肌肉, 并放置在 95% 的乙醇中固定, 于-20℃的条件下冷冻保存。

1.2 DNA 提取和 PCR 扩增

运用酚/氯仿抽提法^[17]从肌肉组织中提取中华绒螯蟹的基因组 DNA, 并使用浓度为 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测每个个体的 DNA 的完整性, DNA 浓度及纯度运用 Quawell 公司生产的微量紫外分光光度计(型号为 Q5000, 美国)进行测定, 将优质的 DNA 样品稀释至 50 ng/μL, 于-20℃的条件下冷冻保存备用。

使用 Primer Premier5.0 软件设计线粒体基因组 D-loop 引物, F: 5'-ACGTAAGTGAATGC-TGTTC-3'; R: 5'-ACCCGTTCCCCTCT-AGAGGA-3'。PCR 反应体系为 25 μL, 包括 DNA 模板 2.5 μL、2×Taq Master Mix(上海近岸科技有限公司)12.5 μL、正反系中华绒螯蟹向引物

表 1 中华绒螯蟹辽河、黄河和长江水系养殖和野生群体的信息采集表
Tab. 1 Collection information of cultured and wild populations of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) from Liaohe River, Yellow River, and Yangtze River

代码 code	水系 river system	地点 location	经度 longitude	纬度 latitude	数量 number
LC	辽河 Liaohe River	辽宁省盘锦市 Panjin City, Liaoning	122.08°E	41.01°N	41
LW	辽河 Liaohe River	辽宁省盘锦市 Panjin City, Liaoning	122.70°E	40.70°N	53
HC	黄河 Huanghe River	山东省东营县 Dongying City, Shandong	118.74°E	37.59°N	46
HW	黄河 Huanghe River	山东省东营县 Dongying City, Shandong	118.52°E	37.61°N	46
YC	长江 Yangtze River	上海市崇明县 Chongming County, Shanghai	121.26°E	31.74°N	30
YW	长江 Yangtze River	上海市崇明县 Chongming County, Shanghai	121.18°E	31.76°N	46

注: LC 表示辽河养殖群体, LW 表示辽河野生群体; HC 表示黄河养殖群体, HW 表示黄河野生群体; YC 表示长江养殖群体, YW 表示长江野生群体。

Note: LC indicates cultured population of Liaohe River, LW indicates wild population of Liaohe River; HC indicates cultured population of Yellow River, HW indicates wild population of Yellow River; YC indicates cultured population of Yangtze River, YW indicates wild population of Yangtze River.

(10 $\mu\text{mol/L}$)各 1.25 μL 和 ddH₂O 7.5 μL 。PCR 反应条件为: 94℃预变性 5 min; 而后进行 30 个循环, 每个循环包括: 94℃变性 30 s, 54℃退火 30 s, 72℃延伸 90 s; 最后 72℃链延伸 10 min, 4℃保存。所得 PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶的电泳检测, 并由生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序分析。

1.3 数据处理

测得序列通过 CLUSTAL 软件^[17-18]进行排序和人工校对。利用 MEGA 5.1 软件^[19-20]计算其碱基数量、变异位点数(V)、简约信息位点数(P_i), 基于 Kimura 双参数模型^[21]计算各个种群之间的平均遗传距离。利用 DNAsp version5.10.1^[22]计算单倍型数目(H)、单倍型多样性(H_d)、核苷酸多样性(π)、平均核苷酸差异数(K)和群体遗传分化指数(F_{ST})。运用软件 Network^[23]分析得到单倍型的网状图。然后利用 Arlequin 3.11 软件^[24]对种群内和种群间方差进行分子方差分析(analyses of molecular variance); UPGMA 聚类树由 NTSYS-pc 2.1 软件^[25]构建。

2 结果与分析

2.1 群体遗传多样性

本实验成功测定了中华绒螯蟹线粒体 D-loop 基因序列, 长度为 477 bp。LC、LW、HC、HW、YC 和 YW 群体中共检测了 262 个个体, 其中变异

位点数分别为 33、36、56、38、38 和 33 个, 简约位点数分别为 21、21、26、22、23 和 18 个, 单倍型数量分别为 21、27、29、22、20 和 26 个(表 2)。D-loop 基因序列的 A+T 碱基的平均含量(82.0%)均显著地高于 C+G 的含量(18.0%), 碱基组成表现出明显的偏依性。

就单倍型而言, 在 262 只中华绒螯蟹中共检测到 110 个单倍型, 包括 90 个独有单倍型和 20 个共享单倍型。6 个群体中占有比例最多的单倍型是 Hap1, 为 12.21%, 次之分别为 Hap2、Hap18、Hap8、Hap6、Hap17、Hap32、Hap25 和 Hap63 等(图 1)。6 个群体的单倍型多样性指数 H_d 的范围为 0.88889~0.96522, 对于养殖群体, 单倍型多样性最高的是 HC, 最低的是 LC; 对于野生群体, 单倍型多样性最高的为 LW, 最低的为 YW。核苷酸多样性指数的范围为 0.00887~0.01602, 养殖群体中, 核苷酸多样性最高的是 HC, 最低的是 LC; 对于野生群体, 核苷酸多样性最高的为 HW, 最低的为 YW(表 2)。然而, 6 个群体之间单倍型多样性和核苷酸多样性均没有显著性差异。对中华绒螯蟹群体进行中性检验, 结果显示群体的 Tajima's D 值和 Fu's F_s 值均为负。其中, LW、HC 和 YC 群体均表现出显著性差异, YW 群体表现出极显著差异(表 2)。

表 2 辽河、黄河和长江水系养殖和野生中华绒螯蟹群体的遗传信息表
Tab. 2 The genetic information of cultured and wild Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) populations from Liaohe River, Yellow River, and Yangtze River

项目 item	LC	LW	HC	HW	YC	YW
样本数 sample number	41	53	46	46	30	46
变异位点数 variable sites number	33	36	56	38	38	33
简约位点数 parsimony informative sites number	21	21	26	22	23	18
单倍型数 haplotype number	21	27	29	22	20	26
单倍型多样性 haplotype diversity	0.90000	0.93033	0.96522	0.91981	0.92874	0.88889
核苷酸多样性 nucleotide diversity	0.01322	0.01203	0.01602	0.01398	0.01387	0.00887
Tajima's D	0.52694	0.87969	1.10628	0.30400	0.97468	1.39954
Fu's F_s	1.93779	7.55069*	6.84575*	2.65779	4.76836*	11.07145**

注: *表示显著水平为 $0.01 < P < 0.05$; **表示显著水平为 $P < 0.01$ 。LC 表示辽河养殖群体, LW 表示辽河野生群体, HC 表示黄河养殖群体, HW 表示黄河野生群体, YC 表示长江养殖群体, YW 表示长江野生群体。

Note: * indicates a significant level of $0.01 < P < 0.05$, ** indicates a significant level of $P < 0.01$. LC indicates cultured population of Liaohe River, LW indicates wild population of Liaohe River, HC indicates cultured population of Yellow River, HW indicates wild population of Yellow River, YC indicates cultured population of Yangtze River, YW indicates wild population of Yangtze River.

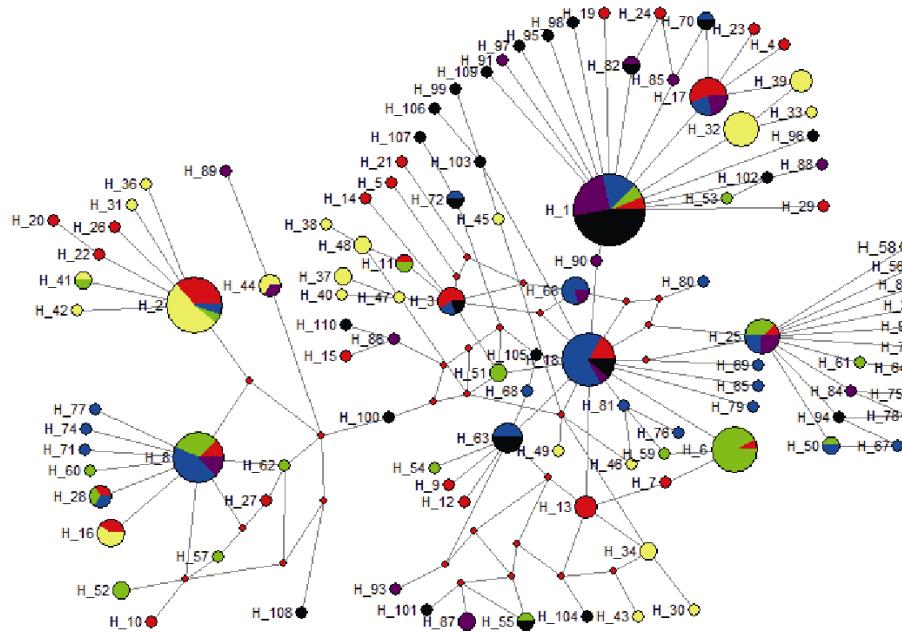


图1 辽河、黄河和长江水系养殖和野生中华绒螯蟹群体线粒体 DNA D-loop 序列的单倍型网状图
圈大小与单倍型的频率成正比; 绿色为辽河养殖蟹(LC), 蓝色为辽河野生蟹(LW), 红色为黄河养殖蟹(HC),
黄色为黄河野生蟹(HW), 紫色为长江养殖蟹(YC), 黑色为长江野生蟹(YW). H_1-H_110 为单倍型 1-110.

Fig. 1 The median-joining network of 110 haplotypes of mtDNA D-loop sequence in cultured and wild Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) populations from Liaohe River, Yellow River, and Yangtze River

Sizes of the circles are proportional to the frequency of each haplotype. Green corresponds to cultured adult crab from Liaohe River (LC); Blue corresponds to wild adult crab from Liaohe River (LW); Red corresponds to cultured adult crab from Yellow River (HC); Yellow corresponds to wild adult crab from Yellow River (HW); Purple corresponds to cultured adult crab from Yangtze River (YC); Black corresponds to wild adult crab from Yangtze River (YW). H_1-H_110 indicate haplotype 1-110.

2.2 群体遗传结构

6个群体之间的遗传距离中, YC 和 YW 群体之间的遗传距离最小, 为 0.0119; HW 和 YC 群体之间的遗传距离最大, 为 0.0173。在 3 个养殖群体之间, HC 和 YC 群体之间的遗传距离最大($D_a=0.0168$), LC 与 YC 群体之间的遗传距离最小($D_a=0.0150$); 3 个野生群体相比, HW 与 YW 群体间的遗传距离最大($D_a=0.0164$), LW 和 HW 群体次之($D_a=0.0161$), LW 与 YW 群体的遗传距离最小($D_a=0.0121$)(表 3)。

两群体之间的 F_{ST} 值显示, 仅仅 LW 和 YC、YC 和 YW 群体之间没有显著性差异($P>0.5$), LC 群体分别和 LW、HC 群体有显著性差异($0.01 < P < 0.05$), 其他群体之间均存在极显著差异($P<0.01$) (表 3)。6 个群体之间的 F_{ST} 均为正值。其中, HW 和 YW 群体之间的遗传分化系数最大($F_{ST}=0.3338$), LW 与 YC 群体之间的 F_{ST} 值最小($F_{ST}=0.0203$)(表 3)。

表3 辽河、黄河和长江水系养殖和野生中华绒螯蟹群体间的遗传距离 D (下对角线)和遗传分化指数 F_{ST} (上对角线)

Tab. 3 Genetic distance D (below diagonal) and genetic differentiation index F_{ST} (above diagonal) of cultured and wild Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) populations from Liaohe River, Yellow River, and Yangtze River

群体 population	LC	LW	HC	HW	YC	YW
LC	0.0521*	0.0298*	0.1671**	0.0764**	0.1714**	
LW	0.0132		0.0620**	0.2237**	0.0203	0.0897**
HC	0.0156	0.0153		0.0929**	0.0728**	0.1588**
HW	0.0160	0.0161	0.0162		0.2204**	0.3338**
YC	0.0150	0.0137	0.0168	0.0173		0.0246
YW	0.0139	0.0121	0.0155	0.0164	0.0119	

注: 右上角是基于 Kimura 的配对 F_{ST} , 左下角为遗传距离。LC 表示辽河养殖群体, LW 表示辽河野生群体, HC 表示黄河养殖群体, HW 表示黄河野生群体, YC 表示长江养殖群体, YW 表示长江野生群体。^{*}表示差异显著水平为 $0.01 < P < 0.05$, ^{**}表示差异显著水平为 $P < 0.01$ 。

Note: The pairwise F_{ST} based on Kimura 2P in upper right corner, genetic distance among populations in lower left corner. LC indicates the cultured population of Liaohe River, LW indicates the wild population of Liaohe River, HC indicates the cultured population of Yellow River, HW indicates the wild population of Yellow River, YC indicates the cultured population of Yangtze River, YW indicates the wild population of Yangtze River. ^{*}indicates a significant level of $0.01 < P < 0.05$, ^{**}indicates a significant level of $P < 0.01$.

对 6 个群体内进行分子变异分析(AMOVA), 发现存在较高的遗传变异(87.06%), 而群体间的遗传变异较小(12.94%), 6 个群体总的遗传分化指数 F_{ST} 为 0.12938($P=0.0000$) (表 4)。对 6 个群体进

行 UPGMA 的聚类分析, 并基于遗传距离构建系统发育树, 结果显示, YC 和 YW 群体聚为一支, 然后与之相近的是 LW 群体和 LC 群体, 最后与 HC 群体和 HW 群体相连(图 2)。

表 4 辽河、黄河和长江水系养殖和野生中华绒螯蟹群体的分子变异分析结果
Tab. 4 Analysis of molecular variation (AMOVA) of cultured and wild Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) populations from Liaohe River, Yellow River and Yangtze River

变异来源 source of variation	自由度 df	方差总和 sum of square	变异组分 variance component	变异百分比/% percentage of variation	总遗传分化 total genetic differentiation
群体间 among populations	5	166.236	0.66271 Va	12.94	0.12938 ($P=0.0000$)
群体内 within populations	256	1141.626	4.45948 Vb	87.06	
总计 total	261	1307.863	5.12218	100	

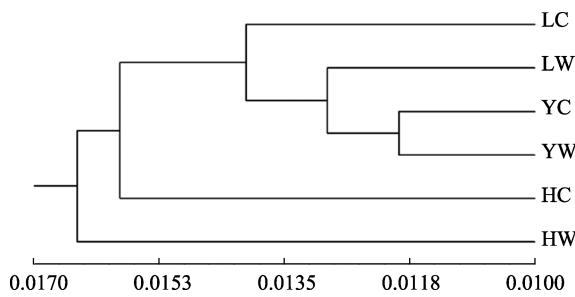


图 2 基于 UPMGA 构建辽河、黄河和长江水系中华绒螯蟹养殖和野生群体的系统聚类图

LC 表示辽河养殖群体, LW 表示辽河野生群体, HC 表示黄河养殖群体, HW 表示黄河野生群体, YC 表示长江养殖群体, YW 表示长江野生群体。标尺下刻度为遗传距离。

Fig. 2 The cluster of cultured and wild Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) populations from Liaohe River, Yellow River and Yangtze River based on UPMGA
LC indicates the cultured population of Liaohe River, LW indicates the wild population of Liaohe River, HC indicates the cultured population of Yellow River, HW indicates the wild population of Yellow River, YC indicates the cultured population of Yangtze River YW indicates the wild population of Yangtze River. The lower scale is for the genetic distance.

3 讨论

3.1 中华绒螯蟹遗传多样性分析

在某种程度上, 遗传多样性是动物物种进化和分化的基础, 它决定物种适应环境变化的能力^[26-27]。核苷酸多样性的高低是判断群体遗传多样性水平的重要指标之一。本研究中, 运用线粒体 D-loop 区基因片段, 比较分析了辽河、黄河和长江水系养殖和野生中华绒螯蟹群体的遗传多样性。6 个群体线粒体 D-loop 基因序列 A+T 碱基的平均含量(82.0%)显著高于 C+G 的含量(18.0%),

碱基组成表现出明显的偏倚性, 这与其他十足目动物线粒体 D-loop 区的核苷酸组成特点相似^[28-30], 符合节肢动物线粒体 DNA 的 AT 富集区(AT-rich region) GC 碱基缺乏而 AT 含量高的现象。

核苷酸多样性(P_i)和单倍型多样性(H_d)是评价种群遗传多样性的重要指标, 其值越大, 则种群的遗传多样性就越高。本研究中 6 个群体的遗传多样性均较高, 就养殖群体而言, 单倍型多样性和核苷酸多样性的高低均呈现出相同的趋势, HC 群体最高, YC 群体次之, 最低的是 LC 群体。本研究结果表明, 黄河养殖群体遗传多样性最高, 这与先前基于微卫星的研究结果不同^[4]。这可能是由于选择分子标记不同造成的。刘青等^[4]研究中选择的核基因组上有 29 个微卫星标记, 而本研究选择的线粒体标记属于“第二套遗传系统”, D-loop 基因属于高变异区域, 发生更多的突变从而使物种的遗传多样性增大。对于野生群体, 单倍型多样性从高到低的顺序分别为: LW>HW>YW, 核苷酸多样性的顺序从高到低为: HW>LW>YW, 这与先前的研究结果类似^[31-32]。本研究中 3 个河蟹野生群体的“单倍型多样性高和核苷酸多样性低”, 产生这一类型的原因可能是这些群体在经历了瓶颈效应^[33]之后, 曾有群体数量快速膨胀。对相同水系养殖和野生中华绒螯蟹群体的遗传多样性进行比较, 除辽河野生群体的遗传多样性高于辽河养殖群体外, 另外两个水系均是养殖群体遗传多样性高于野生群体, 造成这一现象的原因可能是野生中华绒螯蟹由于过度捕捞、环境污染

和水利工程阻挡其洄游通道等原因导致野生种群数量变小,因而长江和黄河水系野生河蟹的遗传多样性较低,养殖群体遗传多样性相对较高可能是由于跨流域盲目引种等原因造成^[34]。另外,对这6个中华绒螯蟹群体进行中性检验,结果显示,群体的 Tajima's *D* 值和 Fu's *F_s* 值均为负值。其中, LW、HC 和 YC 群体均表现出显著性差异, YW 群体表现出极显著差异。这与之前刘青等^[4]的研究相似,表明这些群体都具有复杂种群历史,推测中华绒螯蟹曾发生大规模的群体扩张事件。同时,王中清等^[35]在奇、偶年中发现长江水系中华绒螯蟹野生群体均存在瓶颈效应,朱泽远等^[36]在研究中均发现几个中华绒螯蟹养殖群体都存在瓶颈效应。结合以上研究,表明中国辽河、黄河和长江水系的中华绒螯蟹种群正在面临持续性的种质衰退,因此应当更加重视对中华绒螯蟹种质资源的保护及合理开发。

3.2 中华绒螯蟹群体遗传结构分析

种群之间的遗传距离以及种群分化指数是衡量种群多态性程度的重要指标,二者的值越大,表明种群多态性程度越高^[37]。本研究结果显示,这3个中华绒螯蟹养殖群体的遗传距离呈现趋势为: HC 和 YC 群体之间的遗传距离最大, LC 和 HC 群体次之, 遗传距离最小的是 LC 和 YC 群体; 而3个中华绒螯蟹野生群体的遗传距离呈现的趋势与之完全相同。这说明黄河和长江水系中华绒螯蟹群体之间的亲缘关系相对较远,而辽河和长江水系中华绒螯蟹群体之间的亲缘关系相对较近,但总体上遗传距离并不大。其主要原因可能是自1980年以来,长江水系中华绒螯蟹群体的天然苗种资源逐年减少,同时人们对中华绒螯蟹的需求量日益增大。1984年,辽河水系蟹苗开始被大量引入南方地区,致使辽河和长江水系中华绒螯蟹群体间的基因交流频繁。另外,中华绒螯蟹在养殖过程中的逃逸现象也比较普遍,推测由此加剧了长江以及辽河地区中华绒螯蟹天然群体间的种质混杂程度,从而导致辽河和长江水系中华绒螯蟹野生群体的遗传距离较近^[38]。

基于线粒体 D-loop 区分析 6 个中华绒螯蟹群体的遗传分化,结果显示,仅仅 LW 和 YC、YC

和 YW 群体之间均没有显著性差异,这印证了 20 世纪 80 年代辽河水系蟹苗大量引入到长江水系,造成频繁的基因交流,致使遗传分化降低的事实^[38]; LC 群体分别和 LW、HC 群体有显著性差异,其他群体之间均存在极显著差异。6 个中华绒螯蟹群体 AMOVA 分析结果显示群体遗传差异主要发生在群体内,占有比例为 87.06%,群体间的遗传分化指数 *F_{ST}* 为 0.12938(*P*<0.01),说明群体之间存在一定程度的遗传分化。使用 NTSYS-pc 2.1 软件中 UPGMA 法对 6 个中华绒螯蟹养殖和野生群体的线粒体 D-loop 区进行系统发育树的构建,由图可以得知: YC 和 YW 群体先聚为一支,然后依次与 LW、LC、HC 和 HW 群体相聚,表明长江水系养殖和野生群体的亲缘关系最近,与之相距最远的是黄河野生群体。由于这个聚类树是以群体之间的遗传距离为单位构建的,从总体上可以看出,长江和辽河水系中华绒螯蟹先聚在一起,最后才和黄河水系中华绒螯蟹相聚。推测可能是因为辽河水系中华绒螯蟹群体跨地域引种而导致一定程度的混杂^[4]。本研究采用天然地理种群结合相关养殖地理群体,能侧面反映出地理种群间天然的基因流和因养殖活动中的跨区域引种和养殖群体逃逸产生的基因流动^[4]。

线粒体基因组上的分子标记是水产动物种群遗传研究中的常用标记,主要包括 D-loop、Cyt *b*、COI、COII、12S 和 16S 等,由于这些标记通常位于线粒体上的不同区域^[39],其进化速率和判断长度都存在差别,因此将这些标记分别用于相同几个种群的遗传多样性评估中,结果通常存在一定差异^[31, 40]。因此,采用全线粒体基因组或多个分子标记联用来评价动物种群结构和遗传多样性更为全面和可靠,但是有着成本高、耗时长和工作量大等缺点^[41]。此外,核基因组分子标记具有信息量大、多态性高、稳定性强等优点^[42],今后需要结合线粒体全基因组和核基因组来综合评价不同地理种群中华绒螯蟹的种群遗传,以挖掘和利用优异种质资源。

综上,辽河、黄河和长江水系中华绒螯蟹养殖和野生群体都具有较高的遗传多样性,但长江和黄河野生群体的遗传多样性已经低于其养殖群

体, 这可能与野生资源量下降和养殖群体种质混杂有关, 因此, 今后需要进一步加强中华绒螯蟹野生资源保护, 选育人工优良品质进行池塘养殖, 防止养殖群体种质混杂和退化。

参考文献:

- [1] Bureau of Fisheries and Fishery Management, Ministry of Agriculture. China Fisheries Statistical Yearbook in 2017[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2017. [农业部渔业渔政管理局. 2017 中国渔业统计年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2017.]
- [2] Sui L Y, Wu X G, Wille M, et al. Effect of dietary soybean lecithin on reproductive performance of Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* (H. Milne-Edwards) Broodstock[J]. Aquaculture International, 2009, 17(1): 45-56.
- [3] Sui L Y, Mathieu W, Cheng Y X, et al. Larviculture techniques of Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*[J]. Aquaculture, 2011, 315(1-2): 16-19.
- [4] Liu Q, Liu H, Wu X G, et al. Genetic variation of wild and cultured populations of Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* from the Yangtze, Huanghe, and Liaohe River basins using microsatellite marker[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2015, 46(4): 958-968. [刘青, 刘皓, 吴旭干, 等. 长江、黄河和辽河水系中华绒螯蟹野生和养殖群体遗传变异的微卫星分析[J]. 海洋与湖沼, 2015, 46(4): 958-968.]
- [5] Zhao H L, Wu X G, Jiang X D, et al. Comparative study on gonadal development and nutritional composition among Yangtze, Huang, and Liao River populations of adult female *Eriocheir sinensis* cultured in earth ponds[J]. Journal of Fisheries of China, 2017, 41(1): 109-122. [赵恒亮, 吴旭干, 姜晓东, 等. 池塘养殖条件下长江、黄河和辽河种群中华绒螯蟹雌体卵巢发育和营养组成的比较研究[J]. 水产学报, 2017, 41(1): 109-122.]
- [6] Ying G, Chen T G, Yabe M. An economic analysis of consumer awareness towards China's GAP certification scheme for crab aquaculture[J]. Journal of Rural Problems, 2011, 47(2): 243-248.
- [7] Li Y, Li S F, Wang C H, et al. Establishment and application of morphological discrimination model for juveniles *Eriocheir sinensis* from Liaohe, Yangtze and Oujiang rivers[J]. Journal of Fisheries of China, 2001, 25(2): 120-126. [李勇, 李思发, 王成辉, 等. 三水系中华绒螯蟹幼蟹形态判别程序的建立和使用[J]. 水产学报, 2001, 25(2): 120-126.]
- [8] Li C H, Li S F, Xing Y R, et al. Growth performance and its genotype-environment interaction analysis of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) populations from the Yangtze River and the Liaohe River in ponds[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2002, 26(4): 335-341. [李晨虹, 李思发, 邢益于, 等. 池养长江蟹、辽中华绒螯蟹生长性能及其遗传-环境交互作用分析[J]. 水生生物学报, 2002, 26(4): 335-341.]
- [9] Wang W, Xu C, Zhang W B, et al. Comparative studies on morphological differences among four local populations of mitten crab[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2007, 23(6): 648-653. [王武, 徐灿, 张文博, 等. 四个地方种群绒螯蟹形态差异的比较研究[J]. 中国农学通报, 2007, 23(6): 648-653.]
- [10] Li S F, Zou S M. Phylogenesis of populations of mitten crabs (*Eriocheir sinensis*) in six river systems of mainland China: RAPD fingerprinting marker[J]. Journal of Fisheries of China, 1999, 23(4): 325-330. [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.]
- [11] Li H Y, Hou L, Wei F Y. RAPD analysis of wild, farmed, and premature mitten-handed crab (*Eriocheir sinensis*) in Liaohe River[J]. Fisheries Science, 2003, 22(3): 1-3. [李海燕, 侯林, 魏凤艳. 中华绒螯蟹辽河种群野生、养殖及“性早熟”个体 RAPD 分析[J]. 水产科学, 2003, 22(3): 1-3.]
- [12] Boore J L. Animal mitochondrial genomes[J]. Nucleic Acids Research, 1999, 27(8): 1767-1780.
- [13] Sbisà E, Tanzariello F, Reyes A, et al. Mammalian mitochondrial D-loop region structure analysis: identification of new conserved sequences and their functional and evolutionary implications[J]. Gene, 1997, 205(1-2): 125-140.
- [14] Sun H Y, Zhou K Y, Yang X J. Phylogenetic relationships of the mitten crabs inferred from mitochondrial 16S rDNA partial sequences (Crustacean, Decapoda)[J]. Acta Zoologica Sinica, 2003, 49(5): 592-599. [孙红英, 周开亚, 杨小军. 从线粒体 16S rDNA 序列探讨绒螯蟹类的系统发生关系[J]. 动物学报, 2003, 49(5): 592-599.]
- [15] Ge J C, Xu Z Q, Li X H, et al. Genetic characters of populations from four water systems revealed by mitochondrial *COI* gene sequence[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2011, 18(1): 16-22. [葛家春, 许志强, 李晓晖, 等. 利用线粒体 *COI* 序列分析 4 水系中华绒螯蟹群体遗传学特征[J]. 中国水产科学, 2011, 18(1): 16-22.]
- [16] Xu J, Chan T Y, Tsang L M, et al. Phylogeography of the mitten crab *Eriocheir sensu stricto* in East Asia: Pleistocene isolation, population expansion and secondary contact[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2009, 52(1): 45-56.
- [17] Mamiatis T, Fritsch E F, Sambrook J, et al. Molecular cloning—A laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory. 1982, 545 S., 42 \$[J]. Engineering in Life Sciences, 1985, 5(1): 104.
- [18] Higgins D G, Sharp P M. CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer[J]. Gene, 1988, 73(1): 237-244.
- [19] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA: Molecular evolutionary genetics analysis software for microcomputers[J]. Computer Applications in the Biosciences, 1994, 10(2): 189-191.
- [20] Kumar S, Nei M, Dudley J, et al. MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein

- sequences[J]. *Briefings in Bioinformatics*, 2008, 9(4): 299-306.
- [21] Srivathsan A, Meier R. On the inappropriate use of Kimura-2-parameter (K2P) divergences in the DNA-barcoding literature[J]. *Cladistics*, 2012, 28(2): 190-194.
- [22] Librado P, Rozas J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data[J]. *Bioinformatics*, 2009, 25(11): 1451-1452.
- [23] Horng T, Barton G M, Medzhitov R. TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway[J]. *Nature Immunology*, 2001, 2: 835-841.
- [24] Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis[J]. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 2005, 1: 47-50.
- [25] Rohlf F J. 1997. NTSYS-pc 2.1. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Exeter Software, New York.
- [26] Peng S M, Shi Z H, Hou J L. Comparative analysis on the genetic diversity of cultured and wild silver pomfret populations based on mtD-loop and CO I gene[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2010, 34(1): 19-25. [彭士明, 施兆鸿, 侯俊利. 基于线粒体 D-loop 区与 CO I 基因序列比较分析养殖与野生银鲳群体遗传多样性[J]. 水产学报, 2010, 34(1): 19-25.]
- [27] Byers D L. Evolution in heterogeneous environments and the potential of maintenance of genetic variation in traits of adaptive significance[J]. *Genetica*, 2005, 123: 107.
- [28] Miller A D, Murphy N P, Burridge C P, et al. Complete mitochondrial DNA sequences of the decapod crustaceans *Pseudocarcinus gigas* (Memppidae) and *Macrobrachium rosenbergii* (Palaemonidae)[J]. *Marine Biotechnology*, 2005, 7(4): 339-349.
- [29] Xu J M. Study and application of mitochondrial DNA in crabs[J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2006, 36(6): 879-884. [徐敬明. 蟹类线粒体 DNA 的研究与应用 [J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2006, 36(6): 879-884.]
- [30] Dong Z G, Li X Y, Wang P L, et al. Genetic diversity and genetic differentiation of swimming crab (*Portunus trituberculatus*) from six geographical populations of China Sea based on mitochondrial *D-loop* gene[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37(9): 1304-1312. [董志国, 李晓英, 王普力, 等. 基于线粒体 *D-loop* 基因的中国海三疣梭子蟹遗传多样性与遗传分化研究[J]. 水产学报, 2013, 37(9): 1304-1312.]
- [31] Zhang C, Li Q Q, Wu X G, et al. Genetic diversity and genetic structure of farmed and wild Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) populations from three major basins by mitochondrial DNA *COI* and *Cyt b* gene sequences[J]. *Mitochondrial DNA Part A*, 2018, 29(7): 1081-1089.
- [32] Sui L Y, Zhang F M, Wang X M, et al. Genetic diversity and population structure of the Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*, in its native range[J]. *Marine Biology*, 2009, 156(8): 1573-1583.
- [33] Grant W, Bowen B W. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation[J]. *Journal of Heredity*, 1998, 89(5): 415-426.
- [34] Qiu G F, Xu Q T, Wang L Q, et al. Molecular taxonomy and phylogeny of four species of *Eriocheir* (Decapoda: Brachyura: Grapsidae)[J]. *Acta Zoologica Sinica*, 2001, 47(6): 640-647. [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.]
- [35] Wang Z Q, Huang S, Mao H C, et al. Genetic differentiation analysis of the even and odd year populations of Chinese mitten crab[J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2013, 22(5): 657-664. [王中清, 黄姝, 茅海成, 等. 中华绒螯蟹奇、偶年天然群体的遗传差异分析[J]. 上海海洋大学学报, 2013, 22(5): 657-664.]
- [36] Zhu Z Y, Wang Y J, Shi Y H, et al. Use of fluorescently labeled microsatellites to access genetic diversity of cultured Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*[J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2007, 37(4): 591-596. [朱泽远, 王亚菊, 施用晖, 等. 荧光标记微卫星分析人工饲养中华绒螯蟹的遗传多样性[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2007, 37(4): 591-596.]
- [37] Chen D Q, Zhang C L, Lu C, et al. Polymorphism of D-loop sequence from mitochondrial genomes of different broodstocks of *Gymnocypris przewalskii* (Kessler)[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2006, 13(5): 800-806. [陈大庆, 张春霖, 鲁成, 等. 青海湖裸鲤繁殖群体线粒体基因组 D-loop 区序列多态性[J]. 中国水产科学, 2006, 13(5): 800-806.]
- [38] Xu Z Q, Ge J C, Li Y H, et al. The population genetic structure analysis on four stocks of *Eriocheir sinensis* from different water systems using microsatellite markers[J]. *Journal of Nanjing University (Natural Sciences)*, 2011, 47(1): 82-90. [许志强, 葛家春, 李跃华, 等. 四水系中华绒螯蟹天然群体遗传特征的微卫星标记分析[J]. 南京大学学报(自然科学), 2011, 47(1): 82-90.]
- [39] Boore J L. Animal mitochondrial genomes[J]. *Nucleic Acids Research*, 1999, 27(8): 1767-1780.
- [40] Wang C H, Li C H, Li S F. Mitochondrial DNA-inferred population structure and demographic history of the mitten crab (*Eriocheir sensu stricto*) found along the coast of mainland China[J]. *Molecular Ecology*, 2008, 17(15): 3515-3527.
- [41] Ma H Y, Ma C Y, Li C H, et al. First mitochondrial genome for the red crab (*Charybdis feriata*) with implication of phylogenomics and population genetics[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: Article No. 11524.
- [42] Fang D Q, Roose M L. Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1997, 95(3): 408-417.

Genetic diversity analysis of wild and cultured *Eriocheir sinensis* populations from the Yangtze River, Yellow River, and Liaohe River based on the mitochondrial D-loop gene

SU Yu^{1,2}, ZHANG Cheng^{1,2}, LI Qingqing^{1,2}, ZHENG Haidi⁴, CHENG Yongxu^{1,2,3}, WU Xugan^{1,2,3}

1. Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
2. Shanghai Collaborative Innovation Center for Aquatic Animal Genetics and Breeding, Shanghai Ocean University, Shanghai, 201306, China;
3. National Demonstration Centre for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
4. Zhejiang Aoling Aquaculture seed Industry Co., Ltd, Changxing 313106, China

Abstract: The Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*, is one of the most important aquaculture species in China, and is widely distributed in Eastern Asia. This study was conducted to evaluate the genetic diversity and genetic structure of cultured and wild populations of *E. sinensis* from the Yangtze River, Yellow River, and Liaohe River based on the mitochondrial DNA D-loop region. The results showed that the length of the D-loop gene segment used in this study was 477 bp, which contained a total of 234 variation sites and 131 parsimony information sites for all tested samples. The 262 samples from six populations had 110 haplotypes, which consisted of 90 unique haplotypes and 20 shared haplotypes. The haplotype diversity index (H_d) of the six populations ranged from 0.88889 to 0.96522, and the nucleotide diversity index (π) ranged from 0.00887 to 0.01602. The genetic diversity levels of cultured populations were HC>YC> LC, whereas the levels of wild populations were HW>LW>YW(LC and LW indicate cultured and wild population of Liaohe River respectively, HC and HW indicate cultured and wild population of Yellow River respectively, YC and YW indicate cultured and wild population of Yangtze River respectively). The genetic distance (D_a) ranged from 0.0119 to 0.0173 for the six populations. Regardless of their wild or cultured status, the genetic distance between the Liaohe and Yangtze populations was the smallest among three rivers. The genetic differentiation index (F_{ST}) was 0.12938 among the six populations. A neutral test of the six populations showed the values of Tajima's D and Fu's F_s were negative. The population's Tajima's D and Fu's F_s value test showed that these groups have a complex population history, and it is speculated that *E. sinensis* has had a large-scale group expansion event. The genetic distances of the six populations were analyzed. It was found that the overall genetic distance was not large. The results of genetic differentiation showed that there was no significant difference between the LW and YC, and YC and YW populations. The results of the AMOVA analysis of the six *E. sinensis* populations showed that population genetic differences mainly occurred in the six population. The phylogenetic trees may have resulted from a certain degree of confounding caused by the cross-regional introduction of the Chinese mitten crab population in the Liaohe River system. These results provide valuable information for the evaluation, protection, and exploitation of *E. sinensis* resources.

Key words: *Eriocheir sinensis*; D-loop; geographical population; genetic diversity; genetic structure

Corresponding author: WU Xugan. E-mail: xgwu@shou.edu.cn.