

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2011.00016

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

葛家春^{1,2,3}, 许志强^{1,3}, 李晓晖^{1,2}, 李跃华^{1,3}, 柏如发^{1,3}, 朱清顺^{1,3},
潘建林^{1,3}

1. 江苏省淡水水产研究所, 江苏 南京 210017;

2. 南京师范大学 生命科学学院, 江苏 南京 210097;

3. 江苏省野生水生动物移植驯化及苗种繁育中心, 江苏 南京 210017

摘要: 研究了长江、辽河、瓯江水系野生中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)及其莱茵河水系F₁共 4 个群体 71 个个体的线粒体细胞色素氧化酶亚基I(COI)基因序列, 比对长度包括 628 个位点, 其中变异位点 112 个, 简约信息位点 36 个。基因序列G+C(%)含量较低, 表现出较为明显的碱基组成偏倚性。71 个个体共含 17 种单倍型, 单倍型H13 出现次数最多, 为莱茵河水系F₁、长江以及瓯江群体共享; 单倍型H15、H16 和H17 为瓯江群体特有。样本总体遗传多样性指数较高, 其单倍型多样性指数(H)为 0.862, 核苷酸多样性指数(π)为 0.016 9。各水系野生群体遗传多样性分析表明, 长江群体单倍型多样性指数最高 (0.838 0), 莱茵河水系F₁群体最低(0.725 0); 长江群体与辽河群体间遗传距离最小(0.002 44), 推测长江与辽河 2 群体间基因交流较多; 长江群体内遗传距离(0.017 38)大于除瓯江外的其他水系群体内遗传距离, 揭示长江群体内遗传变异较大、种质混杂较严重。本研究中各群体间的基因流(N_m)均高于 1, 其中长江群体与辽河及莱茵河F₁群体间的基因流分别为 8.27 和 9.72, 表明长江群体与这 2 个群体间曾经有较为频繁的基因交流。分子变异分析(AMOVA)结果显示, 4 个群体总的遗传分化指数为 0.268 5($P < 0.001$), 其中 90.77% 遗传变异存在于各群体内部, 9.23%变异存在于群体间。最小跨度网络图和系统发育分析均没有显示出单倍型与地理位置的对应关系, 已不能形成明显的地理群体结构, 证明当前各水系中华绒螯蟹种质混杂确实存在。
[中国水产科学, 2011. 18(1): 16–22]

关键词: 中华绒螯蟹; 细胞色素氧化酶亚基 I; 不同水系; 遗传特征

中图分类号: S917

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2011)01-0016-07

中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)俗称河蟹, 主要分布于中国长江、辽河、瓯江等水域, 但自然群体主要分布于长江流域^[1]。与瓯江、辽河等水系的中华绒螯蟹相比, 长江水系中华绒螯蟹具有生长速度快、个体大、肉质品质优等特点, 深受消费者青睐。20 世纪 60 年代于长江口发现大眼幼体(蟹苗), 推动了中国中华绒螯蟹增养殖业的迅猛发展^[2]。此后由于长江口天然蟹苗和长江干流中成蟹被过度捕捞, 加上江湖建闸以及水质污染等因素, 从 1982 年起长江中华绒螯蟹天然蟹苗资源开始衰退, 自然产苗量已不能满足生产的需

求^[3]。1984 年起辽河水系中华绒螯蟹苗种开始被大量引入南方, 但辽河水系中华绒螯蟹天然资源量同样很不稳定, 因此瓯江水系中华绒螯蟹苗种亦被大量开发应用。多年来, 由于各水系中华绒螯蟹无序引种, 中华绒螯蟹种质混杂情况已越来越严重^[2-6], 亟需尽快开展相关研究, 以准确分析并评价中国各水系中华绒螯蟹种质状况。

针对该物种, 有学者研究过绒螯蟹属不同物种的分类地位^[7-9]、不同水系中华绒螯蟹群体形态学^[10-13]、蛋白质水平^[14-16]、DNA^[17-25]水平上的种质特征、遗传差异以及系统发育过程^[26-27], 但

收稿日期: 2010-04-02; 修订日期: 2010-05-11.

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划项目(2006BAD01A1305); 江苏省高新技术研究项目(BG2004319); 江苏省水产三项工程项目(K2008); 江苏省科技支撑计划(农业)项目(BE2009336).

作者简介: 葛家春(1973-), 副研究员, 主要从事水生生物学研究. E-mail: gjc09@hotmail.com

对当前不同水系中华绒螯蟹群体间基因交流和种质混杂的研究很少。因此,本研究拟测定当前长江、辽河、瓯江水系野生中华绒螯蟹群体以及莱茵河水系 F_1 群体的线粒体细胞色素氧化酶亚基 I(COI)基因序列,通过序列变异分析,了解当前各水系自然群体中华绒螯蟹的遗传结构、基因交流和种质混杂情况,旨在为后续中华绒螯蟹种质资源保护与合理开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

长江、辽河以及瓯江水系中华绒螯蟹野生群体分别采自江苏省长江南京段、辽宁省辽河辽阳段、浙江省瓯江温州段(图 1)。采样时间为 2009 年 3 月 28 日至 6 月 8 日,每个群体采样量均大于 200 只,样品鉴定参照 GB/T 19783-2005 进行。样品活体运输至实验室后 -20°C 冷冻保存。莱茵河水系中华绒螯蟹 F_1 于 2005 年取自国家级江苏高淳长江水系中华绒螯蟹原种场,95%酒精浸泡保存。

1.2 方法

1.2.1 DNA模板制备 随机从长江群体、辽河群体、瓯江群体及莱茵河水系 F_1 群体中取 20

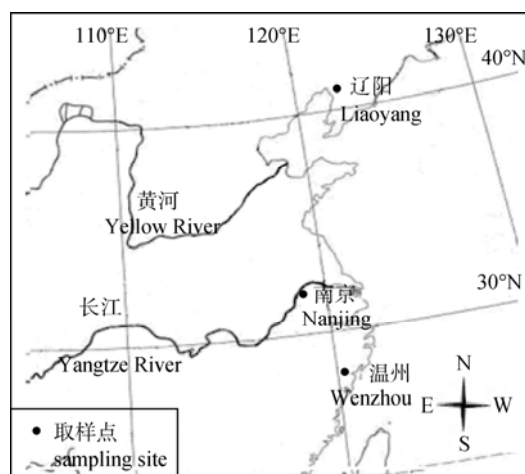


图 1 中华绒螯蟹 3 个野生群体采样地点

Fig.1 Sampling sites of three wild *Eriocheir sinensis* populations 只蟹用于测序分析。取其步足肌肉组织,常规酚-氯仿法提取基因组 DNA,1%琼脂糖凝胶电泳检测基因组 DNA 的完整性,紫外分光光度法检测样品 DNA 浓度及纯度。

1.2.2 PCR 扩增及序列测定 参照 Folmer 等^[28]报道合成引物用于线粒体 COI 基因扩增和序列测定扩增。引物由上海英骏生物公司合成,COI-F: 5'-GGTCAACAAATCATAAGATATTGG-3'; COI-R: 5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'。PCR 反应体系(TAKARA, 大连宝生物科技有限公司)为 50 μL , 其中 10 $\times$ PCR buffer 5 μL , Mg^{2+} (2.5 mmol/L) 5 μL , dNTP (2.5 mmol/L) 3.5 μL , 正反向引物各 1.5 μL (10 nmol/L), *Taq* 酶 0.5 U, DNA 模板 2 μL (50 ng/ μL), ddH₂O 补足至 50 μL 。用 Biometra PCR 仪扩增,反应共设 30 个循环,循环前 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min,每个循环包括 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 40 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 60 s; 循环结束后于 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。扩增产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测,以标准 DL2000 Ladder(TAKARA)估算产物大小。将电泳产物切胶纯化克隆至 *pEASY-T1* 载体,重组子转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞,均匀涂布于 Amp+LB 平板。37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养后,挑取菌落进行 PCR 验证,对含有目的基因片段的克隆进行扩大培养,每个个体挑选 1 个克隆送至上海英骏生物工程公司进行双向测序,PCR 产物纯化试剂盒及 *pEASY-T1* 载体均购自北京全式金生物技术有限公司。

1.2.3 数据统计与分析 通过双向测序获得中华绒螯蟹线粒体 COI 序列,经 SeqManII(DNASTAR Inc)软件拼接并赋予人工校对后,用 Clustal X 软件进行比对, Mega 3.0 软件进行序列变异分析, Modeltest 3.06 计算构建系统发生树的最适模型,以及 Mega 3.0 构建 NJ 分子系统树。通过单倍型多样性(haplotype diversity, H)和核苷酸多样性(nucleotide diversity, π)分析当前不同水系野生中华绒螯蟹群体的遗传多样性。利用 DnaSP 4.0 计算各群体间的基因交流情况, ARLEQUIN 3.1 软件分析单元型之间的最小突变步数和最小跨度网络(Minimum Spanning Network, MSN)。通过 AMOVA (Analysis of Molecular Variance)分析研究群体内及群体间遗传变异。

2 结果与分析

2.1 序列变异分析

对获得的 4 个群体共 71 个中华绒螯蟹个体的线粒体 COI 基因序列进行比对, 比对长度包括 628 个位点, 其中有变异位点 112 个, 简约信息位点 36 个, 单核苷酸多态性位点 76 个。平均 A、T、G、C 碱基含量分别为 27.7%, 34.7%, 17.0%, 20.6%。中华绒螯蟹线粒体 COI 基因 G+C(%)含量较低, 表现出较为明显的碱基组成偏倚性。基因序列变异主要发生在三联密码子的第 3 个碱基上, 符合蛋白质编码基因第 3 位点进化最快的一般规律。

4 个群体 71 个个体有 17 种单倍型(表 1)。长江群体与莱茵河水系F₁群体间有 3 个共享单倍型(H2/H5/H13), 其中单倍型H13 出现次数最多, 为莱茵河水系F₁群体、长江群体以及瓯江群体的共享单元型, 单倍型H15、H16 以及H17 为瓯江群体所特有的单倍型。

总体上 4 群体的中华绒螯蟹遗传多样性指数较高(表 2), 其单倍型多样性指数(H)为 0.862, 核苷酸多样性指数(π)为 0.016 9。其中, 长江群体的单倍型多样性指数最高 (0.838), 莱茵河水系F₁群体最低(0.725); 核苷酸多样性指数(π)以瓯江群体最高(0.0248), 莱茵河水系F₁群体最低(0.001 7)。

2.2 群体结构及分子遗传变异

4 个中华绒螯蟹群体内部的Kimura双参数遗传距离(Kimura 2-parameter distance, K 2-P)介于 0.001 68~0.025 30 之间(表 3)。其中长江群体和瓯江群体内部遗传距离较大, 分别为 0.017 38 和 0.025 30; 莱茵河水系F₁群体内遗传距离最小, 为 0.001 68。4 个群体间的K 2-P遗传距离为 0.002 44~0.027 53, 其中长江群体与辽河群体间的遗传距离最小(0.002 44), 瓯江群体与莱茵河水系F₁群体间的遗传距离最大(0.027 53)。长江群体与莱茵河水系F₁群体(9.72)、辽河群体(8.27)间的基因流较大, 表明长江群体与这 2 个群体间曾发生过较为频繁的基因交流。分子变异分析(AMOVA)结果显示, 4 个

表 1 中华绒螯蟹 COI 基因单倍型(H1–H17)在不同群体中的分布
Tab. 1 Distribution of COI gene haplotypes in four *Eriocheir sinensis* populations

群体 population	单倍型 haplotype																
	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16	H17
LYH	1	2			2			3					8				
CJ		2	1		4		1		2	1	1		6				
LH				1	4	2		4				2		5			
OJ			1							3			8		1	1	5

注: LYH、CJ、LH、OJ分别代表莱茵河群体F₁、长江群体、辽河群体及瓯江群体。
Note: LYH, CJ, LH, OJ stand for the population of Rhine River F₁, Yangtze River, Liao River and Ou River, respectively.

表 2 中华绒螯蟹群体单倍型多样性(H)及核苷酸多样性(π)
Tab. 2 Haplotype and nucleotide diversities of four *Eriocheir sinensis* populations

群体 population	样本量 number of individuals	单倍型数 number of haplotypes	单倍型多样性 (H) haplotype diversity	核苷酸多样性(π) nucleotide diversity
LYH	16	5	0.725	0.0017
CJ	18	8	0.838	0.0028
LH	18	6	0.831	0.0028
OJ	19	7	0.801	0.0243
总体 Total	71	17	0.862	0.0169

注: LYH、CJ、LH、OJ分别代表莱茵河群体F₁、长江群体、辽河群体及瓯江群体。
Note: LYH, CJ, LH, OJ stands for the population of Rhine River F₁, Yangtze River, Liao River and Ou River, respectively.

群体总的遗传分化指数为 0.092 4, 其中大部分遗传变异(90.77%)存在于中华绒螯蟹各群体内部,

群体间的遗传变异较少(9.23%)($P<0.001$) (表 4)。

2.3 最小跨度网络图和聚类分析

由最小跨度网络图显示(图 2), 整个网络图分为较明显的两支, 其中瓯江群体特有单倍型 H15、H17 以及 H16 构成独立的一小支, 其他单倍型构成一独立的大支。其中单倍型 H13 位于网络图的中心, 推测这个单倍型可能较为原始, 其他单倍型由其衍生而来。总体而言, 本研究中各中华绒螯蟹群体间存在较为广泛的共享单倍型, 未表现出明显的地理位置与单倍型之间的对应关系。以邻接法(NJ)构建的系统关系图也显示(图 3), 中华绒螯蟹 4 个群体混杂分布在系统发育图上, 不能按地理位置形成对应族群。其中长江群体与辽河群体、莱茵河群体的混杂聚集情况相对明显, 提示这几个群体间的亲缘关系较近。

表 3 中华绒螯蟹野生群体内及群体间遗传距离以及群

体间的基因流
Tab. 3 Average pairwise difference and gene flow within or between four *Eriocheir sinensis* populations

群体 population	LYH	CJ	LH	OJ
LYH	0.00168*	9.72	4.69	1.01
CJ	0.01020	0.01738*	8.27	1.41
LH	0.00947	0.00244	0.00290*	1.00
OJ	0.02753	0.02037	0.01969	0.02530*

注: 对角线以下数值表示群体间遗传距离; 对角线以上数值表示群体间基因流; *表示群体内平均 K 2-P 遗传距离. LYH、CJ、LH、OJ 分别代表莱茵河群体 F1、长江群体、辽河群体及瓯江群体.

Note: Average pairwise difference between populations is below diagonal. Gene flow is above diagonal. Average pairwise difference within populations is along diagonal and marked with *. LYH, CJ, LH, OJ stands for the population of Rhine River F1, Yangtze River, Liao River and Ou River, respectively.

表 4 中华绒螯蟹野生群体线粒体 CO I 基因序列分子变异分析
Tab. 4 AMOVA results of mtDNA COI gene sequences of four *Eriocheir sinensis* populations

变异来源 sources of variation	自由度 df	平方和 sum of squares	方差组分 variance component	变异百分率/% percentage of variance	显著性检验 P^*	总遗传分化 global divergence
群体间 among populations	3	3.303	0.041	9.23	$P<0.001$	
群体内 within populations	67	26.001	0.400	90.77	$P<0.001$	0.0924
总和 total	70	29.304	0.441			

注: * P 值表示比观察值变异大的概率, 其通过将群体中的样本经过 1 023 次随机排列改变计算而得到。
Note: * P -values are the probabilities of having a more extreme variance component than the observed values alone. Probabilities were calculated by 1 023 random permutations of individuals across populations.

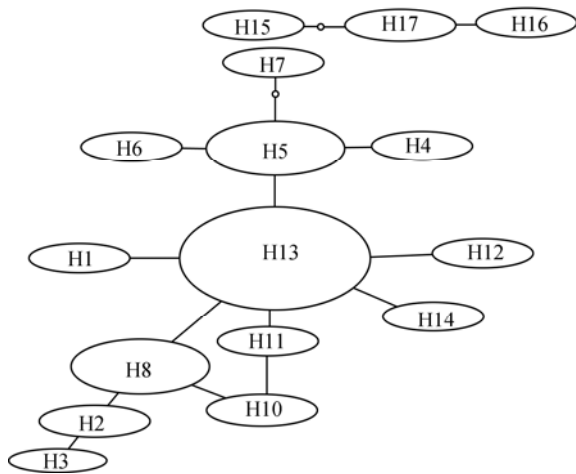


图 2 4 个中华绒螯蟹群体 COI 单倍型间的最小跨度网络图

Fig.2 Minimum spanning network of all COI gene haplotypes in four *Eriocheir sinensis* populations

3 讨论

3.1 种质混杂历史及本研究 mtDNA COI 序列分析证据

20 世纪 60 年代中期至 80 年代初期, 中国中华绒螯蟹增殖产业以采集天然蟹苗进行人工放流为主, 在北起内蒙、辽宁, 南至珠江口, 西至新疆博斯腾湖都有长江水系中华绒螯蟹的人工增殖放流活动^[2-6]。随着人工增殖规模的不断扩大, 导致了长江水系天然成蟹以及蟹苗资源被过度捕捞, 资源量急剧衰退。1984 年辽河、瓯江蟹苗开

始被大量开发并在全中国范围内被广泛利用,打破了各水系中华绒螯蟹的天然分布格局,直接影响了长江口亲蟹资源的遗传结构,使长江水系中华

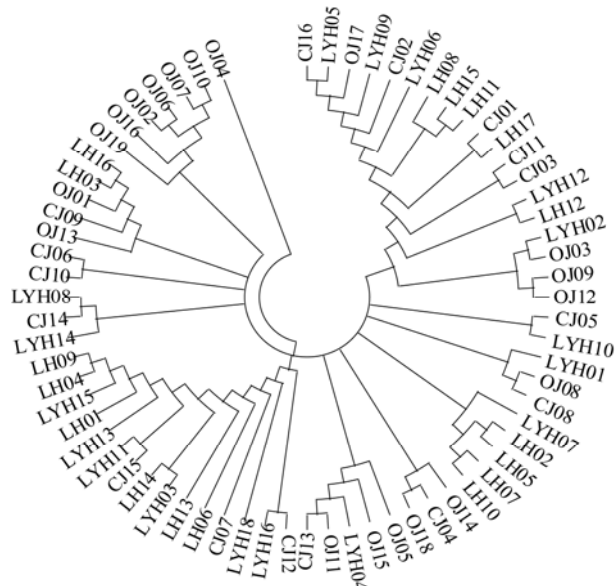


图3 基于线粒体COI序列变异构建的4个野生中华绒螯蟹群体的邻接树

Fig. 3 Phylogenetic tree (NJ) based on COI sequences of four *Eriocheir sinensis* populations

绒螯蟹种质资源不可避免地出现了混杂^[2-6]。20世纪90年代以来,人工育苗技术成熟,生产单位为了降低成本,无序利用不同水系及小规格亲蟹进行苗种生产,加上培育苗的盲目放流,进一步加剧了各水系中华绒螯蟹种质混杂的程度^[3-6]。

在本研究中,mtDNA COI序列分子变异分析、遗传距离和NJ系统发育结果证明,长江、辽河和瓯江(特别是长江与辽河间)不同水系中华绒螯蟹群体间的种质混杂情况确实存在。分子变异分析结果显示,4个中华绒螯蟹群体90.77%的遗传变异来自群体内部,存在于群体间的遗传变异(9.23%)较少,这和Chang等^[17]以微卫星标记对2个原种场群体和2个地方养殖群体的研究结果一致。对4个群体间及群体内的遗传距离分析可知,长江、瓯江群体内个体间遗传距离已大于长江、辽河及莱茵河F₁3个群体间的遗传距离,提示长江、瓯江群体内遗传变异较大,并由此推测这2个群体的种质混杂情况更为严重。长江群体与辽河群体间遗传距离小于长江群体与瓯江群体间的

遗传距离,推测长江群体与辽河群体间的基因交流更为频繁。基于COI序列的NJ系统发育结果也表明,本研究中4个群体的不同个体混杂分布在系统发育树上,不能形成显著的地理群体结构,并没有按地理位置形成对应族群。基因流是1个群体迁移至另1个群体时将某基因带到新群体产生的基因流动。通常认为,基因流大于1表明群体间的基因交流较为频繁,群体间遗传分化较小;当基因流小于1时,表明群体间产生了分化^[29]。本研究中几个群体间的基因流均大于1(表3),其中长江与辽河群体间的基因流较大(8.27),瓯江与长江(1.41)、瓯江与辽河(1.00)群体间的基因流相对较小。综上所述,在mtDNA COI序列水平上,长江、辽河和瓯江(特别是长江与辽河间)不同水系中华绒螯蟹群体间种质混杂情况确实存在。

生物遗传多样性是生命进化和物种分化的基础,在一定程度上决定了该物种在自然或人为条件下对环境改变的适应能力。本研究结果表明,无论在物种水平,还是在群体水平,中华绒螯蟹群体均表现出较高的遗传多样性,这与Chang等^[17]、Ma等^[18]和潘建林等^[19]用微卫星技术对中华绒螯蟹所进行的研究结果一致。原因可能是多年来不同水系中华绒螯蟹存在着频繁的个体交流,加剧了各水系中华绒螯蟹的种质混杂,同时也在一定程度上提高了当前各水系中华绒螯蟹的遗传多样性。

3.2 瓯江水系中华绒螯蟹群体遗传学特征

最小跨度网络图分析结果表明,瓯江群体所特有的单倍型H15/H16/H17与其他单倍型之间的亲缘关系较远,其在最小跨度网络图中形成单独的一支。遗传距离分析结果表明,瓯江野生群体内部遗传距离较大,与长江、辽河、莱茵河水系F₁群体间的遗传距离较远,基因交流相对较小。同样NJ聚类分析结果显示,瓯江群体与其他3个群体相比,其个体在系统树上的聚集情况相对集中。孙红英等^[27]采用16S rDNA对大陆绒螯蟹进行系统分化研究时,曾在瓯江水系野生群体内发现合浦绒螯蟹所特有的单元型,认为瓯江是中华绒螯蟹与合浦绒螯蟹2个亚种在地理分布上

的过渡地带。由于本研究未同时采集合浦绒螯蟹样本进行分析, 因此尚不能确定 H15/H16/H17 单倍型所代表的个体是否为合浦绒螯蟹与中华绒螯蟹发生遗传渐渗的结果。

3.3 莱茵河水系 F_1 中华绒螯蟹群体遗传学特征

李思发等^[20]利用 RAPD 技术对来自欧洲的中华绒螯蟹群体与长江水系中华绒螯蟹群体进行了遗传分析, 认为欧美的中华绒螯蟹群体来源于中国长江水系。王武等^[10]比较了莱茵河野生中华绒螯蟹(简称“莱茵蟹”)与长江水系中华绒螯蟹的外部特征, 通过聚类分析将长江蟹与“莱茵蟹”划为一组。因此, 本研究选取莱茵河水系 F_1 群体与长江、辽河以及瓯江群体进行比较研究, 发现莱茵河水系 F_1 群体遗传多样性低于其他群体, 原因可能是早期“移居”到欧美的中华绒螯蟹形成的“地理隔离”, 避免了其他相近群体的基因污染, 因此遗传多样性指数较低。莱茵河水系 F_1 群体与当前长江水系中华绒螯蟹群体间的遗传距离较小, 两群体间存在最多的共享单元型, 基因流 N_m 值最大, 都说明莱茵河水系 F_1 群体与长江群体具有较为密切的亲缘关系。

3.4 展望

各水系中华绒螯蟹种质资源的形成, 是长期选择和适应的结果。由于本研究中每个水系仅选择 1 个采样位点, 研究结果尚不能全面反映各水系中华绒螯蟹的遗传特征和系统发生。根据当前中华绒螯蟹种质资源混杂情况, 需采集更多有代表性的样本, 以深入研究当前不同水系中华绒螯蟹群体内及群体间的遗传差异和基因交流情况。同时本研究利用线粒体 COI 基因序列研究了当前各水系中华绒螯蟹的遗传特征, 尽管线粒体 DNA 能够提供更多的遗传变异信息, 且所需样本量低, 但因线粒体 DNA 为母系遗传, 仅能反应母系种群的遗传结构, 无法检测出由于父系原因所导致的种群遗传信息。在后续的工作中可结合微卫星等核基因检测技术开展进一步的研究。

参考文献:

[1] 徐兴川. 关于中华绒螯蟹品质保持问题的探讨[J]. 水产科

技情报, 1991, 18(1): 17-19.

- [2] 赵乃刚. 长江中华绒螯蟹种质资源混杂对养蟹业的影响[J]. 内陆水产, 1998, 5: 2-4.
- [3] 戴祥庆. 上海地区河蟹养殖业的发展与思考[J]. 水产科技情报, 1998, 25 (4): 147-149.
- [4] 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.
- [5] 王成辉, 李思发. 中华绒螯蟹种质研究进展[J]. 中国水产科学, 2002, 9(1): 92-96.
- [6] 王武. 我国中华绒螯蟹养殖的现状和发展前景[J]. 内陆水产, 1998 (4): 2-4.
- [7] Sakai T. Description of new genera and species of Japanese crabs, together with systematically and biogeographically interesting species[J]. Res Crust, 1983, 12: 1-44.
- [8] Guo J Y, Ng N K, DAI A, et al. The taxonomy of three commercially important species of mitten crabs of the genus *Eriocheir* de Hann, 1835 (Crustacea: Decapoda: Brachyura: Grapsidae) [J]. Raffles Bull Zool, 1997, 45(2): 445-476.
- [9] 戴爱云. 绒螯蟹属支序分类学的初步分析[J]. 动物分类学报, 1988, 13 (1): 22-26.
- [10] 王武, 张文博, 边文翼, 等. 绒螯蟹三个种群形态判别比较[J]. 水产科技情报, 2005, 32(2): 81-83.
- [11] 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.
- [12] 李勇, 李思发, 王成辉, 等. 三水系中华绒螯蟹形态判别程序的建立和使用[J]. 水产学报, 2001, 25 (2): 120-126.
- [13] 李晨虹, 李思发. 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: 形态判别[J]. 水产学报, 1999, 23(4): 337-342.
- [14] 乔新美, 曹维孝, 邹世平. 长江、瓯江中华绒螯蟹几种同工酶的比较分析[J]. 淡水渔业, 1994, 24 (5): 10-13.
- [15] 程家骅, 王云龙, 许加武, 等. 苏北南部沿海几种蟹类蛋白和同工酶的比较研究[J]. 中国水产科学, 1998, 5(1): 10-17.
- [16] 郑曙明, 吴青. 中华绒螯蟹同工酶的研究[J]. 水生生物学报, 1994, 18(2): 183-185.
- [17] Chang Y M, Liang L Q, Ma H T, et al. Microsatellite analysis of genetic diversity and population structure of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) [J]. J Genet Genom, 2008, 35: 171-176.
- [18] Ma H T, Chang Y M, Yu D M, et al. Microsatellite variation among four populations of *Eriocheir sinensis* [J]. Zool Res, 2007, 28(2): 126-133.
- [19] 潘建林, 牟大凯, 郝莎, 等. 中华绒螯蟹 *Eriocheir sinensis* 两个地理种群的微卫星 DNA 多态性分析[J]. 南京大学学报: 自然科学, 2006, 42(5): 457-461.

- [20] 李思发, 邹曙明. 欧、美中华绒螯蟹源于中国长江水系中华绒螯蟹的遗传证据[J]. 水产学报, 2002, 26(6): 493-497.
- [21] 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.
- [22] 项超美, 陆仁后, 谢浩, 等. 四种十足目甲壳动物遗传差异的 RAPD 分析[J]. 水生生物学报, 1998, 22 (3): 251-256.
- [23] 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.
- [24] 谢浩, 陆仁后, 项超美, 等. 利用 RAPD 技术对三种绒螯蟹亲缘关系的研究[J]. 水生生物学报, 1999, 23 (2): 120-125.
- [25] Zhao J L, Murphy R W, Li S F. Relationships of mitten crabs (*Eriocheir*) from inland rivers of China inferred from cytochrome oxidase subunit I sequences [J]. Biochem Systemat Ecol, 2002, 30(10): 931-941.
- [26] Tang B P, Zhou K Y, Song D X, et al. Molecular systematics of the Asian mitten crabs, genus *Eriocheir* (Crustacea: Brachyura) [J]. Mol Phylogenet Evol, 2003, 29 (2): 309-316.
- [27] 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.
- [28] Folmer O, Black M, Hoeh W, et al. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates[J]. Mol Mar Biol Biotechnol, 1994, 3(5): 294-299.
- [29] Wright S. Evolution in mendelian population[J]. Genetics, 1931, 16: 97-159.

Genetic characters of *Eriocheir sinensis* populations from four water systems revealed by mitochondrial COI gene sequence

GE Jiachun^{1,2,3}, XU Zhiqiang^{1,3}, LI Xiaohui^{1,2}, LI Yuehua^{1,3}, BAI Rufa^{1,3}, ZHU Qingshun^{1,3}, PAN Jianlin^{1,3}

1. Freshwater Fisheries Research Institute of Jiangsu Province, Nanjing 210017, China;

2. School of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China;

3. Jiangsu Engineering Research Center for Wild Aquatic Animals Introduction & Hatching, Nanjing 210017, China

Abstract: Sequences of mitochondrial COI gene of 71 individuals of *Eriocheir sinensis* which were sampled from Yangtze River, Liao River, Ou River population and F₁ generation of Rhine River population were determined. The result showed that there were 112 variable sites population and 36 parsimony-informative sites in total 628 sites. The content of (G+C) was lower, showing obvious bias of base composition. Seventeen haplotypes were detected among the 71 samples. Haplotype H13 which occurred most frequently was shared by the populations from Yangtze River, Ou River, and F₁ generation of Rhine River population. Haplotypes H15, H16 and H17 were unique in the population from Ou River. Haplotype diversity index (*H*) was 0.862 and nucleotide diversity index (π) was 0.016 9 indicating that the genetic diversity index of total samples was high. Yangtze River population had the highest (0.838) while the F₁ generation of Rhine River population had the lowest (0.725 0) haplotype diversity index among the four populations. The genetic distance between Yangtze River population and Liao River population was closer than that among others and it can be inferred that the genetic exchange between them was more frequently. The genetic distance within Yangtze River population (0.017 38) was higher than those of others except of Ou River population which indicating that higher genetic variation and more serious genetic admixture exist within Ou River population. Gene flows (N_m) among four populations were all above 1, especially between Yangtze River population and Liao River population (8.27) and between Yangtze River and F₁ generation of Rhine River (9.72), respectively, which indicated that the population of Yangtze River had frequent gene flow with the other two before. Analysis of molecular variance (AMOVA) showed that genetic differentiation index of all the four populations was 0.2685 ($P < 0.001$), of which the majority (90.77%) existed within populations, and the rest existed among populations (9.23%). Haplotype network diagram and phylogenetic analysis did not show any correlation between haplotypes and geographical location, suggesting that currently there exists genetic admixture of *Eriocheir sinensis* in the four water systems, and the four populations could not form distinct geographic group

structures.[Journal of Fishery Sciences of China, 2011,18(1): 16–22]

Key words: *Eriocheir sinensis*; cytochrome oxidase subunit I(COI); water system; genetic character