

文章编号: 1674-5566(2013)05-0657-08

中华绒螯蟹奇、偶年天然群体的遗传差异分析

王中清¹, 黄 姝¹, 茅海成¹, 周 陆², 王成辉¹

(1. 上海海洋大学 农业部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306; 2. 上海市松江区水产技术推广站, 上海 201611)

摘要: 中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 的生命周期通常为两年, 繁殖结束生命也就终止。在理论上, 相邻两个年份中华绒螯蟹群体间不存在遗传婚配或基因交流, 而存在奇年与偶年两个系谱之分。为检验长江野生中华绒螯蟹奇、偶年份群体的遗传差异, 应用 18 对微卫星引物, 对 2004-2011 共 7 年采集的中华绒螯蟹长江口天然繁殖群体进行了遗传分析。结果表明: (1) 偶年群体 (2004、2006、2008、2010) 的观测杂合度和期望杂合度显著高于奇年群体 (2007、2009、2011), $P < 0.05$; (2) 奇、偶年群体间的遗传分化差异显著 ($P = 0.024$); (3) 基于遗传距离的 NJ 聚类关系树表明: 奇、偶年群体形成较为明显的两个遗传聚类; (4) 主成分分析 (PCA) 和 STRUCTURE 遗传聚类分析均表明: 奇、偶年类群的分化明显, 但两群体间存在一定程度的遗传渐渗与基因交流; (5) 两个偶年 (2004、2006) 和两个奇年 (2007、2011) 群体检测到显著的遗传瓶颈效应。研究结果综合表明: 长江天然中华绒螯蟹群体存在较明显的奇年与偶年差异, 但两者间也存在一定程度的基因交流。

研究亮点: 分析了中华绒螯蟹长江口奇、偶年野生群体的遗传差异与关系, 在国内较早探讨水产动物奇、偶年群体的遗传特性。为中华绒螯蟹种质资源管理、保护及开发利用提供了相关依据。

关键词: 中华绒螯蟹; 长江水系; 微卫星标记; 遗传分化

中图分类号: S 917

文献标志码: A

中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*), 俗称河蟹, 属甲壳纲 (Crustacea), 十足目 (Decapoda), 方蟹科 (Grapsidae), 绒螯蟹属 (*Eriocheir*), 是我国土著的生殖洄游型水产经济生物。此外, 由于船舶压舱水的转运, 中华绒螯蟹已在欧洲和北美等地形成了数量庞大的群体^[1-2], 成为一个典型的入侵种和国际知名的水产生物^[3-4]。

由于过度捕捞、天然生态环境变化、人工苗种转运等因素的影响, 我国中华绒螯蟹种质资源遭到了严重的破坏, 如 2002-2003 年, 长江口天然蟹苗产量只有几公斤, 近几年天然蟹苗虽有所上升, 但远低于 20 世纪 50-90 年代的产量。研究和评估不同时期中华绒螯蟹天然群体的种质资源状况, 对于保护和利用这一优异种质资源具有重要意义^[5-9]。由于中华绒螯蟹性成熟后只繁

殖一次 (代) 后, 亲本即死亡, 不能进行多年份重复繁殖。因而, 不同年份间繁殖个体在理论上不会发生生殖交流^[10]。因此, 从理论上, 中华绒螯蟹存在奇年与偶年两大类群。为检验中华绒螯蟹是否存在奇、偶年份类群, 本文以长江天然群体为研究对象, 应用微卫星分子标记分析了奇、偶年群体间的遗传结构和差异, 探讨两个类群的遗传关系。此外, 研究结果进一步为长江水系中华绒螯蟹种质资源保护、合理开发利用和良种选育提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 样本采集

在 2004 年、2006-2011 年的每年 12 月 9-12 日, 在长江天然亲蟹的最主要繁殖场所——长

收稿日期: 2013-04-30 修回日期: 2013-06-03

基金项目: 上海市中华绒螯蟹产业技术体系 (D8003100208); 国家星火计划重大项目 (2011GA680001)

作者简介: 王中清 (1988—), 男, 硕士研究生, 研究方向为水产动物种质资源与种苗工程。E-mail: 356347253@qq.com

通信作者: 王成辉, E-mail: wangch@shou.edu.cn

江口九段沙水域采集当年的洄游中华绒螯蟹(雄蟹 130 ~ 160 g, 雌蟹 90 ~ 120 g), 共 7 个年份群体(表 1), 分别简称 Y2004, Y2006, Y2007, Y2008, Y2009, Y2010, Y2011。测量每只样本的体重、壳长、壳宽后, 取步足肌肉于 95% 乙醇中保存, 然后置于 4 °C 冰箱中贮藏备用。

表 1 本研究中的中华绒螯蟹样本信息

Tab. 1 Sample information of the Chinese mitten crab used in this study

群体代号	采集地点	采集时间	样本量
Y2004	长江口九段沙	2004 年 12 月	29
Y2006	长江口九段沙	2006 年 12 月	31
Y2007	长江口九段沙	2007 年 12 月	26
Y2008	长江口九段沙	2008 年 12 月	29
Y2009	长江口九段沙	2009 年 12 月	31
Y2010	长江口九段沙	2010 年 12 月	34
Y2011	长江口九段沙	2011 年 12 月	39

1.2 DNA 提取与 PCR 扩增

DNA 提取采用饱和氯化钠法^[11]。应用已报道的 10 对绒螯蟹微卫星引物(编号 DQ114480 - AF536350)^[8-9]和本实验室自行开发的 8 对微卫星引物(编号 JX987251 - JX987258)对样本进行 PCR 扩增, 各引物序列及退火温度如表 2 所示。PCR 反应体积为 10 μ L, 包括 1 μ L 基因组 DNA (20 ng/ μ L), 5 μ L Mix 反应液 (0.2 μ mol/L dNTPs, 1.5 μ mol/L MgCl₂, 0.5 μ mol/L *Taq* DNA 聚合酶), 正反向引物各 0.5 μ L (5 μ mol/L), 蒸馏水 3 μ L。PCR 扩增程序: 94 °C 5 min, 94 °C 30 s, 退火(表 2) 30 s, 72 °C 1 min, 35 个循环后, 最后 72 °C 延伸 10 min。

PCR 产物经 1.5% 琼脂糖电泳初检显示条带清晰无杂带后, 用 QIAxcel 全自动毛细管核酸分析系统进行基因分型和片段大小计算。

1.3 数据分析

利用 FSTAT 2.9.4^[12] 软件检测各群体的遗传变异情况, 包括等位基因数 (A)、有效等位基因数 (N_e)、观测杂合度 (H_o)、期望杂合度 (H_e) 和近交系数 (F_{IS})。应用 GENEPOP version 4.0.10^[13] 软件检测群体内所有位点是否偏离哈代-温伯格平衡 (Hardy-Weinberg equilibrium, HWE)。用

BOTSTEIN^[14] 等公式计算微卫星位点多态信息含量 (PIC)。

运用 Arlequin 3.5^[15] 软件进行群体间遗传分化指数 (F_{ST}) 计算与分子方差分析 (AMOVA)。利用 POPGENE 1.3^[16] 软件计算群体间 Nei's 遗传距离 (D_A), 用 MEGA 5.0^[17] 软件中的邻接法 (NJ 法) 构建群体的遗传聚类图。

为进一步了解群体间的相互遗传关系, 应用 GENALEX 6.4^[18] 软件对 7 个群体微卫星结果进行主成分分析 (principal coordinate analysis, PCA)。此外, 应用 STRUCTURE 2.3.4^[19] 软件分析群体的遗传聚类关系, 为探求 7 个群体的最佳聚类分组, 选择混合模式运行程序 (admixture model), 聚类数值 (K) 设置为从 1 到 7, 每个连续的 K 值, 计算 6 次, 预热 (burn-in) 次数为 20 000, 随后进行 1 000 000 次重复的正式计算。所得到的聚类用 DISTRUCT 程序^[20] 绘制成彩色格状图, 群体的最佳聚类值根据 FALUSH^[21] 等的方法确定。

根据各位点等位基因频率, 应用 Bottleneck 软件^[22] 检测各群体是否经历遗传瓶颈效应, 共采用两种方法进行分析。一种是显著性检验法, 采用两阶突变模型 (two-phased mutation model, TPM) 和步移突变模型 (stepwise mutation model, SMM)^[23-24]。另一种是模型-漂变指示法, 如果群体没有经历遗传瓶颈效应, 则该群体接近突变-漂变平衡, 呈现出正常的 L-型分布, 而经历遗传瓶颈的群体则偏离 L-型分布^[25]。

2 结果与分析

2.1 群体遗传多样性

应用的 18 对微卫星引物所扩增的条带清晰, 部分图谱如图 1 所示。Hardy-Weinberg 平衡检验发现各群体有较多位点显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡, 其中 2004 年、2006 年、2007 年、2008 年、2009 年、2010 年有 16 个位点, 2011 年有 18 个位点。分析微卫星的等位基因数 (A) 为 6 ~ 19, 有效等位基因数 (N_e) 为 4.22 ~ 14.25, 多态信息含量 (PIC) 为 0.649 0 ~ 0.896 6。

表 2 18 对微卫星引物序列及 PCR 反应特征
Tab. 2 Primer sequences and PCR characteristics for the 18 microsatellite loci in the study

引物	GenBank 登录号	引物序列(5' - 3')	重复单元	退火温度/°C	片段大小/bp
A9	JX987251	F:GCAATGAGACTCAACAGGAGA R:AATGTGGCTCACCTGACGT	(GA) ₇ (GT) ₃₉	60	211 ~ 266
A15	JX987252	F:TTGAACCTGGCGTTTAGGA R:TGAAGGGGAACCTGAGATGT	(AC) ₂₂ (AC) ₆	60	201 ~ 266
B3	JX987253	F:GAGAAACGAGCAGCATTTCC R:CACAACAACACGGAGTATCGG	(AC) ₂₂	60	198 ~ 233
Chx23	JX987254	F:CCTGAGGGTAAGCGAATACA R:CCTGAGGGTAAGCGAATACA	(CA) ₇	56	136 ~ 168
Chx24	JX987255	F:ATCACGATAGTCGCTGCTCAG R:ATCATGTTGAACGCGGTAGG	(AC) ₁₃	56	159 ~ 201
Chx26	JX987256	F:GAAATGTGAGACGCAACACC R:ACAACAACACGGAGTATCGG	(AC) ₂₂	60	158 ~ 203
Chx29	JX987257	F:AACAACAGCGATACCCTCAC R:CAACCAAGATGAGGCTGAAG	(CA) ₅ (AC) ₂₇	62	146 ~ 186
Chx31	JX987258	F:ACGCTGCTTGTGACTATTG R:ACTCGTCTCTTGTTTACAGCG	(TG) ₁₈	62	100 ~ 125
ES17	DQ114480	F:ACTATGCCCTTTCCTATGTATGAA R:GCGGTTGTTAAAGCCAGAAT	(TG) ₁₇	56	400 ~ 450
ES29	DQ114481	F:GTGAGAGCGGAAGGGTTTGAA R:CGTTGCTGGCTGCCCTTATCTC	(TG) ₂₂	58	405 ~ 455
ES30	DQ114482	F:TTCCTCCCCTCCGCTTCCTCA R:GCCCAGCAGCTGAACATGATGAAA	(CA) ₁₇	58	141 ~ 191
Esin06	AF536339	F:CCCTTCCATTATCTTAACTG R:CTGTGCTTCTGCTGTATG	(CA) ₁₄	56	119 ~ 164
Esin18	AF536340	F:CACCCTAAGGTTCCGTAA R:AAGCACCCATAAGTCAATGTA	(GT) ₂₇	50	156 ~ 206
Esin30	AF536342	F:CACGCTGATAAGGCTCTT R:TGAATCCAAACTTAGATAAACTG	(GT) ₃₀	50	137 ~ 197
Esin36	AF536343	F:GAGCGAGTATGCAAATGACTAAT R:TTCATTACGAACAAAACACTAA	(CA) ₂₉	50	205 ~ 300
Esin67	AF536347	F:TTTGGGATTCACCTTGTCAACTT R:CGACGCACGACAGAGGAGAGG	(GT) ₁₁	50	144 ~ 160
Esin75	AF536349	F:CGGCACTGAAAGATTACAGGCTG R:TTCCAAATAGTTATGACGGATGA	(AC) ₁₀	50	170 ~ 215
Esin87	AF536350	F:GCCATAAGGAGGACAATGATG R:GCATGTAATGGCAAGACTCTA	(GT) ₄ (GT) ₁₃	56	130 ~ 160

注:F 为正向引物;R 为反向引物。

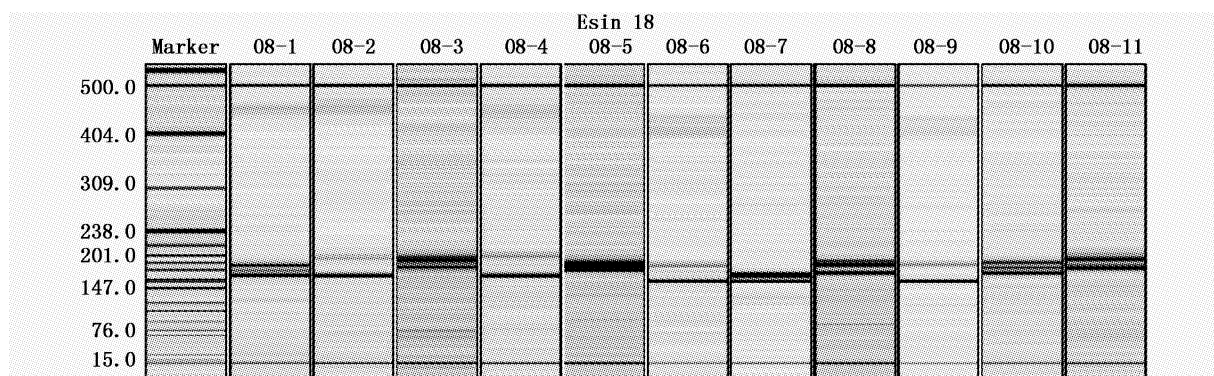


图 1 引物 Esin18 在 2008 年份群体中的扩增电泳图
Fig. 1 The PCR amplification profiles from the primer Esin18 in the population Y2008

观察发现,偶年群体的平均观测杂合度(H_o)和平均期望杂合度(H_e)均显著高于奇年群体($P < 0.05$,表3),近交系数(F_{IS})显著低于奇年群体($P < 0.05$),其他遗传变异参数差异不显著($P > 0.05$)。

表3 中华绒螯蟹7个年份群体的遗传变异参数统计

Tab.3 Summary of genetic variation in the seven populations of Chinese mitten crab

群体	样本数	等位基因数	等位基因丰富度	多态信息含量	观测杂合度	期望杂合度	近交系数
偶年群体							
Y2004	29	178	9.764 1	0.820 8	0.576 6	0.854 4	0.329 1
Y2006	31	171	9.338 4	0.811 2	0.575 3	0.843 1	0.321 2
Y2008	29	174	8.917 5	0.820 9	0.630 3	0.853 8	0.265 2
Y2010	34	174	9.595 1	0.826 5	0.635 6	0.856 4	0.260 7
平均值	31	174	9.403 8	0.819 9	0.604 5	0.851 9	0.294 1
奇年群体							
Y2007	26	166	9.564 1	0.801 6	0.373 9	0.837 4	0.558 4
Y2009	31	163	9.482 1	0.784 6	0.526 9	0.820 1	0.361 3
Y2011	39	180	10.226 6	0.819 1	0.551 3	0.827 8	0.352 7
平均值	32	170	9.757 6	0.801 8	0.484 0	0.828 4	0.424 1

2.2 群体遗传分化

7个群体遗传变异的分子方差分析(AMOVA)如表4所示。在这7个群体中,群体间的遗传变异占2.75%,群体内变异占97.25%。当7群体分为奇年和偶年两个类群时,两者存在显著差异($F_{CT}=0.0163, P=0.024$)。当所有群体进行两两比较时,相互间均存在极显著差异($F_{ST}=0.0172 \sim 0.0541, P < 0.01$,表5)。基于等位基因频率计算出各群体间的Nei's遗传距离(表4)表明,2008年和2009年群体间遗传距离最远($D_A=0.4183$),2009年和2011年群体间遗传距离最近($D_A=0.1777$)。用NJ法构建的聚类图(图2)显示,4个偶年群体(Y2004、Y2006、Y2008、Y2010),3个奇年群体(Y2007、Y2009、

Y2011)形成较为明显的两个聚类。

表4 中华绒螯蟹7个群体的遗传变异分子方差分析(AMOVA)

Tab.4 Results of AMOVA in the seven populations of Chinese mitten crab

变异来源	自由度	变异百分比/%	分化指数	P
1个组群(7群体)				
群体间	6	2.75	$F_{ST}=0.0275$	$P < 0.001$
群体内个体间	212	33.49	$F_{IS}=0.3444$	$P < 0.001$
个体内	219	63.76	$F_{IT}=0.3624$	$P < 0.001$
2个组群(奇年;偶年)				
组间	1	1.63	$F_{CT}=0.0163$	$P=0.024$
组内群体间	5	1.79	$F_{SC}=0.0182$	$P < 0.001$
群体内个体间	212	33.26	$F_{IS}=0.3444$	$P < 0.001$
个体内	437	63.32	$F_{IT}=0.3668$	$P < 0.001$

表5 中华绒螯蟹7个群体间的遗传分化指数(F_{ST} 值,左下角)和遗传距离(D_A ,右上角)

Tab.5 Pairwise F_{ST} values (lower-left triangle) and genetic distance (upper-right triangle) among 7 populations of Chinese mitten crab

群体	Y2004	Y2006	Y2007	Y2008	Y2009	Y2010	Y2011
Y2004		0.244 1	0.291 3	0.228 8	0.379 8	0.234 7	0.332 2
Y2006	0.025 0**		0.319 7	0.192 0	0.406 4	0.195 6	0.356 7
Y2007	0.031 6**	0.037 7**		0.269 9	0.269 5	0.285 8	0.253 0
Y2008	0.020 8**	0.017 2**	0.028 6**		0.418 3	0.259 5	0.327 8
Y2009	0.048 2**	0.054 1**	0.034 3**	0.053 3**		0.332 2	0.177 7
Y2010	0.022 2**	0.018 5**	0.031 4**	0.025 8**	0.042 4**		0.290 4
Y2011	0.037 3**	0.042 8**	0.028 6**	0.036 8**	0.020 5**	0.032 4**	

注:**表示差异极显著。

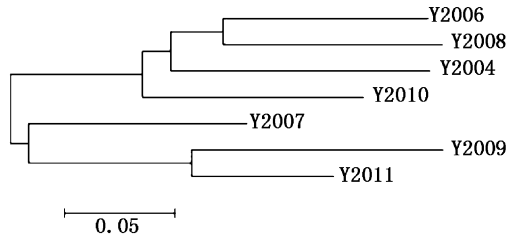


图2 基于 D_A 遗传距离的7个年份中华绒螯蟹的NJ聚类树

Fig.2 NJ clustering tree based on D_A genetic distance from the seven populations of Chinese mitten crab

2.3 遗传瓶颈效应检测

瓶颈效应检测发现,两个偶年群体(Y2004, Y2006)和两个奇年群体(Y2007, Y2011)均存在极显著的遗传瓶颈效应(表6)。根据等位基因频率分布的模型漂变指示法检测发现,7个年份群体均没有发生模型漂变改变,无遗传瓶颈信号。

表6 中华绒螯蟹7个群体遗传瓶颈效应检测结果
Tab.6 Bottleneck test for the seven populations of Chinese mitten crab

群体	检测 P 值				模型漂变指示
	TPM (90%)	TPM (95%)	TPM (98%)	SMM	
Y2004	0.004 8**	0.023 7*	0.118 7	0.228 8	正常
Y2006	0.004 8**	0.010 4*	0.018 2*	0.043 2*	正常
Y2007	0.004 0**	0.007 7**	0.013 9*	0.038 5*	正常
Y2008	0.073 7	0.118 7	0.228 8	0.442 3	正常
Y2009	0.303 8	0.346 6	0.392 7	0.442 3	正常
Y2010	0.023 7*	0.066 5	0.228 8	0.442 3	正常
Y2011	0.002 3**	0.002 8**	0.002 8*	0.002 8*	正常

注:**表示差异极显著,*表示差异显著。

2.4 遗传关系分析

2.4.1 主成分分析

将7个年份的中华绒螯蟹群体进行主成分分析,结果显示奇、偶年群体可以较好地地区分开来,但极少数个体存奇、偶年间的相互混杂(图3)。在个体水平,主成分1(PC1)和主成分2(PC2)解释了总遗传变异的40.35%,主成分2(PC2)和主成分3(PC3)解释了总遗传变异的33.52%。在群体水平,主成分1(PC1)和主成分2(PC2)解释了总遗传变异的67.12%,主成分2(PC2)和主成分3(PC3)解释了总遗传变异的29.85%。

2.4.2 遗传聚类分析

STRUCTURE 遗传聚类分析表明,在 ΔK 检验中,当 $K=2$ 时(图4),出现最高峰值,此时 $\Delta K =$

73.80,显著高于其他 ΔK 值,说明当 $K=2$ 时,为群体的最佳分组(图5)。7个群体明显聚为两类,即奇年群体(2007、2009、2011)聚为一类,偶年群体(2004、2006、2008、2010)聚为一类。进一步分析表明,偶年中有奇年的遗传渐渗,但程度较低,奇年中有偶年的遗传渐渗,且程度稍微明显,这与PCA分析结果相似。其中2007年混杂比较严重,主要为混杂的2008年样本。

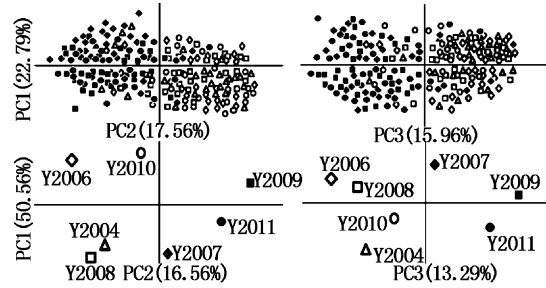


图3 中华绒螯蟹7个年份群体的主成分分析图
Fig.3 Principal coordinate analysis(PCA) of the seven populations of Chinese mitten crab

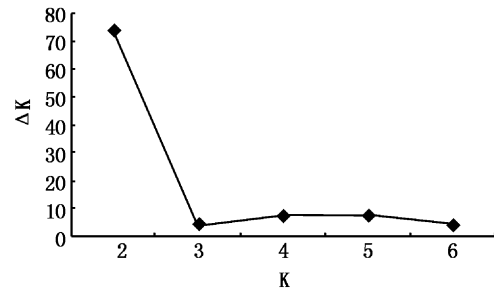


图4 用 Structure 获得的平均似然率值和 ΔK 评估(利用 Structure 软件6次重复计算 ΔK 的平均值)
Fig.4 Plot of mean likelihood values (averaged across 6 runs) and estimate of ΔK for each possible value of K using the data obtained from Structure software

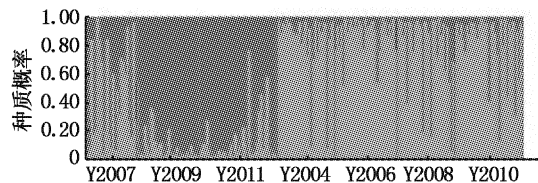


图5 中华绒螯蟹7个年份群体的 STRUCTURE 遗传聚类分析图
Fig.5 STRUCTURE genetic cluster analysis for the seven populations of Chinese mitten crab

3 讨论

3.1 群体遗传多样性

遗传多样性是物种或群体长期进化的产物,了解群体的遗传结构,比较群体杂合度等遗传变异参数,可为选育优良品种和种质保护等提供理论基础和数据支持。杂合度反映群体在多个位点上的遗传变异,是度量群体遗传变异的适宜参数之一。当群体处于哈代-温伯格平衡时,观测杂合度和期望杂合度之间无显著差异,本研究中 7 个群体的观测杂合度介于 0.373 9 ~ 0.635 6,在数值上均低于期望杂合度,说明长江中华绒螯蟹天然群体存在杂合子缺失,这种现象也在其他物种中被发现,如刚果锥虫 (*Trypanosoma congolense*)^[27]、凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*)^[28]。我们选用的位点在以往的研究中是符合 Hardy-Weinberg 平衡的^[8-9],说明种群对平衡的偏离并不是来自于无效等位基因。杂合子缺失会导致纯合子增加,近交衰退机率增高,从而降低物种适应环境变化的能力^[29]。本研究中各群体的近交系数大部分较高,且均为正值,表明杂合子缺失可能与近亲交配有关。这是由于中华绒螯蟹个体的繁殖能力很强,抱卵数量多,幼体在成长阶段附着在亲体腹部繁育,而当脱离母体后,又因为游泳能力较弱,只能作短距离的游动,多数时间攀附于水草或其他水中物体上,仅在幼苗时期随水波被动扩散。因此推测其处于不平衡状态的主要原因是群体存在一定程度的近交。而当一个种群发生近交时,其所有位点会较为显著地出现连锁不平衡^[26],因此本研究中 7 个群体大多数微卫星位点显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡,经 Bonferroni 校正后,仍至少有 16 个位点显著偏离了 Hardy-Weinberg 平衡,表现出显著的杂合子不足。

瓶颈效应分析对于遗传多样性研究较为重要,可为遗传资源保护提供参考和借鉴。瓶颈效应分析结果显示两个偶年群体(2004、2006)和两个奇年群体(2007、2011)存在显著瓶颈效应。瓶颈效应的发生一方面与长江口水体生态环境变化较大有关^[30],如对甲壳动物有很大杀伤的农药杀虫剂等农业面源污染物等,都可破坏野生环境,直接或间接地引起群体数量下降^[31];另一方面与过度捕捞有关,由于目前还存在从长江中大

量捕捞野生亲本,造成野生资源量下降(如长江口天然蟹苗量在 2002、2003 年连续两年只有几公斤),从而引发瓶颈效应。进一步分析各年份之间的观测杂合度发现,观测杂合度由高到低依次为:2010 年、2008 年、2004 年、2006 年、2011 年、2009 年、2007 年,由此可见,偶年中华绒螯蟹的遗传多样性要高于奇年。综合遗传瓶颈结果和近交结果来看,当前需进一步采取有效保护措施,尽可能地避免杂合度下降和近交系数增加,以保护长江中华绒螯蟹的种质资源遗传多样性。

3.2 群体遗传关系

遗传分化指数(F_{ST})是指群体间或个体间的遗传变异占总的遗传变异的大小,群体间遗传分化指数越大,表明群体间分化越明显,群体间的遗传差异也就越大。HAMRICK 等认为以异交为主的物种,90% 的遗传变异发生在群体内部^[32]。本研究的 AMOVA 分析结果表明,仅 2.75% 的遗传变异发生在群体间,而 97.25% 的遗传变异存在于个体间,与上述结论一致。本研究中 7 个群体间的 F_{ST} 值介于 0.017 2 ~ 0.054 1,群体间总的遗传分化指数为 0.027 5 ($P < 0.01$),属于低等程度分化^[33]。进一步比较奇数年之间、偶数年之间、奇偶年份之间的 F_{ST} 值,我们发现相邻 2 个年份之间的 F_{ST} 值明显大于间隔年份之间的 F_{ST} 值(如 2008 年和 2009 年之间的 F_{ST} 值明显大于 2007 和 2009 年以及 2009 和 2011 年之间的 F_{ST} 值),可见对于中华绒螯蟹而言,不同年份对其分化程度有较为重要的影响,这符合中华绒螯蟹的生活史特征,表明奇、偶年存在较为明显的遗传分化。这一现象也在 7 个群体的遗传距离分析结果中得到了验证,即奇数年群体之间的遗传距离、偶数年群体之间的遗传距离都小于奇偶年之间的遗传距离。由此可以推测中华绒螯蟹应存在不同年份即奇、偶年的遗传差异。STRUCTURE 聚类分析和 PCA 主成分分析也显示出奇、偶年群体遗传分化明显,但是奇、偶年群体内也存在一定的遗传分化,但分化程度尚待进一步研究。

参考文献:

- [1] 邹曙明,李思发. 中华绒螯蟹欧洲、美国的移植[J]. 上海水产大学学报, 2002, 11(4): 393-396.
- [2] 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(2): 493-497.

- [3] 王成辉,李思发,刘至治,等. 3种中华绒螯蟹群体线粒体 CO II 基因序列测定与进化分析[J]. 水产学报, 2008, 32(1): 8-12.
- [4] WANG C H, LI S F, FU C Z, et al. Molecular genetic structure and evolution in native and colonized populations of the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis* [J]. *Biology Invasions*, 2009, 11: 389-399.
- [5] WANG C H, LI S F, LI C H. 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, 3515-3527.
- [6] 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.
- [7] 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): 82-86.
- [8] 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, 2011, 47(1): 322-334.
- [9] 马海涛,常玉梅,于冬梅,等. 利用微卫星分子标记分析四个中华绒螯蟹[J]. 动物学研究, 2007, 28(2): 126-133.
- [10] 黄雷,王成辉,李思发. 中华绒螯蟹长江天然群体遗传差异的 AFLP 初步分析[J]. 上海水产大学学报, 2008, 17(4): 385-389.
- [11] 周陆,成起萱,王中清,等. 闽江水系绒螯蟹的表型性状差异与分子遗传差异的比较与分析[J]. 动物学研究, 2012, 33(3): 314-318.
- [12] GOUDET J. FSTAT (version 1.2): a computer program to calculate F-statistics[J]. *Heredity*, 1995, 86:485-486.
- [13] ROUSSET F. GENEPOP'007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux [J]. *Molecular Ecology Resour*, 2008, 8: 103-106.
- [14] BOTSTEIN D, WHITE R L, SKOLNICK M. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms[J]. *American Journal of Human Genetics*, 1980, 32(3): 31-34.
- [15] EXCOFFIER L, LISCHER H. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analysis under Linux and Windows[J]. *Molecular Ecology Resour*, 2010, 10: 564-567.
- [16] YEH F C, YANG R C, BOYLE T, et al. POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis [M]. *Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Canada*, 1999.
- [17] TAMURA K, KUMAR S, NEI M. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. *Molecular Biology Evolution*, 2011, 28:2731-2739.
- [18] PEAKALL R, SMOUSE P E. GENALEX6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research [J]. *Molecular Ecology Notes*, 2006, 6: 288-295.
- [19] EVANNO G, REGNAUT S, GOUDET J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study [J]. *Molecular Ecology Notes*, 2005, 14: 2611-2620.
- [20] ROSENBERG N A. DISTRUCT: a program for the graphical display of population structure [J]. *Molecular Ecology Notes*, 2004, 4(1): 137-138.
- [21] FALUSH D, STEPHENS M, PRITCHARD J K. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies [J]. *Genetics*, 2003, 164(4): 1567-1587.
- [22] PIRY S, LUIKART G, CORNUET J M. Bottleneck: a computer program for detecting recent reductions in the effective size using allele frequency data [J]. *Journal of Heredity*, 1999, 90(4): 502-503.
- [23] DI R A, PETERSON A C, GARZA J C. Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations [J]. *Proceedings of National Academy of Sciences of USA*, 1994, 91: 3166-3170.
- [24] CORNUET J M, LUIKART G. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data [J]. *Genetics*, 1996, 144: 2001-2014.
- [25] LUIKART G, CORNUET J M. Empirical evaluation of a test for identifying recently bottlenecked populations from allele frequency data [J]. *Conservation Biology*, 1998, 12: 228-237.
- [26] CASTRIC V, BERNATCHEZ L, BELKHIR K, et al. Heterozygote deficiencies in small lacustrine populations of brook charr *Salvelinus fontinalis* Mitchell (Pices, Salmonidae): a test of alternative hypotheses [J]. *Heredity*, 2002, 89:27-35.
- [27] MORRISON L J, TWEEDIE A. Discovery of mating in the major African livestock pathogen *Trypanosoma congolense* [J]. *PLoS ONE*, 2009, 4: e5564.
- [28] VALLES J R, CRUZ P. Population genetic structure of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) from Mexico to Panama microsatellite DNA variation [J]. *Marine Biotechnology*, 2005, 6: 475-484.
- [29] 杨锐,喻子牛. 山东沿海褶牡蛎与太平洋牡蛎等位基因酶的遗传变异[J]. 水产学报, 2000, 24(2): 130-133.
- [30] 雷阿林,李志军,李迎喜. 构建长江开发与保护的和谐关系[J]. 科学对社会的影响, 2005(4):26-30.
- [31] 冯建彬,吴春林,马克异,等. 太湖日本沼虾野生群体遗传结构的微卫星分析[J]. 应用生态学报, 2011, 22(6): 1606-1614.
- [32] BROWN A H D, CLEGG M T. *Plant Population Genetics, Breeding, and Genetic Resources* [M]. *Sunderland Massachusetts Sinauer Associates*, 1989: 43-63.
- [33] WRIGHT S. *Evolution and the genetics of populations variability within and among natural populations* [M]. *Chicago: University of Chicago Press*, 1978.

Genetic differentiation analysis of the even and odd year populations of Chinese mitten crab

WANG Zhong-qing¹, HUANG Shu¹, MAO Hai-cheng¹, ZHOU Lu², WANG Cheng-hui¹

(1. Key Laboratory of Freshwater Fishery Germplasm Resources, Ministry of Agriculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Shanghai Songjiang Fisheries Technical Extension Center, Shanghai 201611, China)

Abstract: Generally, the lifespan of a Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) is two years, and then the crab would die after it finishes the reproduction. Theoretically, the Chinese mitten crabs of adjacent two years (e. g. 2010 and 2011) would not conduct genetic mating or gene flow. There is a hypothesis that there were two lineages of the odd and even years in this crab. In this paper, genetic differentiation was analyzed and the hypothesis was tested using seven wild populations (sampled in 2004, 2006 – 2011) from the Yangtze River based on 18 microsatellite loci. The results indicated that: (1) the H_0 and H_E of the odd year populations were significantly lower than those of the even year populations ($P < 0.05$); (2) There were significant pairwise F_{ST} differences ($P = 0.024$) between the odd and even year populations; (3) The phylogenetic dendrograms based on NJ methods showed obvious two clades, one clade consisted of the even year populations, another consisted of the odd populations; (4) Both principal coordinate analysis and STRUCTURE genetic clustering analysis indicated that significant genetic differentiation between the odd and even year populations, but slight genetic introgression would have occurred between them; (5) Genetic bottleneck signal was detected in the two even year populations (2004, 2006) and odd year populations (2007, 2011). The results of this study demonstrated that the Chinese mitten crab in Yangtze River have two lineages of the odd and even year populations, however, there was a certain level of gene flow between the two lineages.

Key words: *Eriocheir sinensis*; Yangtze River system; microsatellite markers; genetic divergence