

基于线粒体控制区序列的三疣梭子蟹 增殖放流亲蟹遗传多样性研究

杨 爽¹, 宋 娜¹, 张秀梅¹, 王云中², 王四杰², 高天翔^{1*}

(1. 中国海洋大学水产学院, 山东 青岛 266003;

2. 山东省水生生物资源养护管理中心, 山东 烟台 264003)

摘要: 为研究山东沿海三疣梭子蟹增殖放流亲蟹群体的遗传多样性状况, 实验采用 536 bp 的线粒体 DNA 控制区片段作为分子标记, 对 4 个亲蟹群体的遗传多样性和遗传结构进行了分析。结果显示, 301 个三疣梭子蟹个体共检测到 155 个单倍型, 4 个群体的单倍型多样性为 0.972 3 ~ 0.993 0, 核苷酸多样性为 0.021 2 ~ 0.023 6, 表现出丰富的遗传多样性。AMOVA 分析和 F_{st} 分析结果均显示, 4 个三疣梭子蟹亲蟹群体间遗传分化微弱, 未形成明显的遗传结构, NJ 系统树中未出现与各群体相对应的的谱系分支。研究表明, 4 个增殖放流亲蟹群体的遗传多样性丰富, 且其遗传结构与放流海域的野生群体间没有明显分化, 种质资源质量较好。此外, 群体历史动态分析显示, 渤海南部和黄海北部的三疣梭子蟹历史上曾经历过群体扩张事件。

关键词: 三疣梭子蟹; 亲蟹; 线粒体控制区; 增殖放流; 遗传多样性

中图分类号: S 931.5

文献标志码: A

三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*) 隶属于十足目 (Decapoda)、梭子蟹科 (Portunidae)、梭子蟹属 (*Portunus*), 广泛分布于我国沿海以及日本、朝鲜、马来西亚群岛等水域^[1]。由于其经济价值高、生长速度快、移动范围小, 常被作为沿岸增殖放流的目标种, 在西北太平洋渔业资源增殖放流中占有重要地位^[2-3]。

1963 年, 日本在濑户内海开始三疣梭子蟹的增殖放流^[4], 至 20 世纪 80 年代, 其苗种生产和放流技术已臻于成熟, 放流数量长期维持较高水平, 仅 1994 年就放流蟹苗 3.1 亿只^[3]。中国于 1986—1988 年首次取得三疣梭子蟹工厂化人工育苗的成功, 并在 3 年内放流 3 期幼蟹 60 万只^[5], 此后较长时间内未开展大规模放流。近十几年来, 由于持续的高强度捕捞和栖息环境的污染, 我国三疣梭子蟹资源出现明显衰退, 年产量由 1996 年的 59 000 t 迅速下降至 2001 年的 11 000 t^[6]。为保护和修复三疣梭子蟹渔业资源,

山东省于 2005 年正式启动实施“山东省渔业资源修复行动规划”, 将三疣梭子蟹列为增殖放流目标种之一, 并在 2008 年将其纳入省全额投资增殖项目^[2]。截至 2013 年, 全省已累计放流二期幼蟹 18.85 亿只, 有效缓解了三疣梭子蟹的资源衰退, 并产生了良好的经济和生态效益。

研究表明, 人工繁育群体遗传多样性低于野生群体的现象在海洋鱼类、贝类和甲壳类中较为常见。Sekino 等^[7]采用线粒体控制区序列和微卫星标记对褐牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 3 个人工繁育群体和 3 个野生群体的遗传多样性进行分析, 结果发现人工繁育群体的遗传多样性明显低于野生群体。Lind 等^[8]使用 6 对多态性引物对大珠母贝 (*Pinctada maxima*) 3 个野生群体和 6 个养殖群体进行微卫星分析, 发现养殖群体等位基因减少、遗传多样性降低。张辉等^[9]比较分析了中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 养殖群体和野生群体的线粒体控制区序列, 发现养殖群体

收稿日期: 2014-01-22 修回日期: 2014-05-19

资助项目: 海洋公益性行业科研专项 (201305043, 201405010); 山东省海洋与渔业厅增殖放流绩效评价项目

通信作者: 高天翔, E-mail: gaozhang@ouc.edu.cn

的遗传多样性略低于野生群体。我国三疣梭子蟹的增殖放流均使用人工繁育苗种,随着放流规模的不断扩大,放流群体很可能对野生三疣梭子蟹种质资源造成影响。因此,研究三疣梭子蟹增殖放流亲蟹的遗传多样性水平、监测放流亲蟹的种质资源状况,对于科学开展三疣梭子蟹增殖放流具有极其重要的意义。

控制区是线粒体 DNA 上惟一的非编码区域,由于缺乏编码选择压力而比其他线粒体片段具有更快的进化速率,在检测种下水平的遗传变异中具有更高的灵敏度^[10],已被广泛应用于海洋生物种群遗传多样性的研究。目前,已有学者运用线粒体 DNA 控制区序列作为分子标记,对三疣梭子蟹野生群体的遗传多样性和遗传结构展开了研究^[11-14],但尚未见线粒体 DNA 在三疣梭子蟹增殖放流亲蟹研究中的报道。本研究利用线粒体控制区序列,对 4 个三疣梭子蟹增殖放流亲蟹群体的遗传多样性进行分析,以期三疣梭子蟹增殖放流的科学开展及其种质资源的合理保护提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 样品采集

本研究所用的 4 个三疣梭子蟹增殖放流亲蟹

群体分别于 2013 年 5 月采自山东沿海的 4 家三疣梭子蟹放流单位(图 1):东营垦利县惠鲁水产养殖有限公司(KL)、潍坊寿光市林海水产育苗场(SG)、潍坊昌邑市海丰水产养殖有限责任公司(CY)和烟台海阳市海洋水产资源增殖站(HY),各单位繁育的苗种仅用于当地三疣梭子蟹增殖放流。所有亲蟹均为当年 4 月海捕的野生抱卵个体,除 CY 群体捕自日照和丹东海域外,其他群体均捕自当地周边海域。待亲蟹产卵后,进行体质量、头胸甲宽和头胸甲高等形态学测量,并取步足冷冻带回实验室,于 -20 °C 低温保存。具体样品信息见表 1。

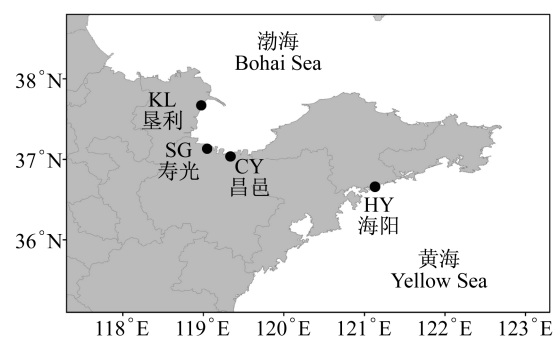


图 1 三疣梭子蟹采样地点

Fig. 1 Sampling sites of *P. trituberculatus*

表 1 三疣梭子蟹 4 个亲蟹群体的样品信息和遗传多样性参数

Tab. 1 Sample information and genetic diversity parameters in four broodstock populations of *P. trituberculatus*

| 群体 population | 样品数 number of samples | 样品来源 sample source | 体质量/g body weight | 头胸甲宽/mm carapace width | 单倍型数 number of haplotypes | 单倍型多样性 haplotype diversity | 核苷酸多样性 nucleotide diversity | 平均核苷酸差异数 mean number of pairwise differences |
|------------------|-----------------------------|--------------------------|-------------------------|------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|--|
| KL | 98 | 垦利外海 | 253.3 ± 88.6 | 170.9 ± 15.4 | 42 | 0.978 3 ± 0.004 3 | 0.021 2 ± 0.010 7 | 11.390 3 ± 5.210 5 |
| SG | 59 | 寿光外海 | 181.2 ± 24.5 | 156.4 ± 12.6 | 49 | 0.993 0 ± 0.004 7 | 0.023 1 ± 0.011 7 | 12.452 4 ± 5.700 4 |
| CY | 84 | 丹东、日照外海 | 205.0 ± 45.5 | 156.0 ± 10.4 | 65 | 0.989 1 ± 0.005 1 | 0.023 6 ± 0.011 9 | 12.706 8 ± 5.785 9 |
| HY | 60 | 海阳外海 | - | - | 28 | 0.972 3 ± 0.007 0 | 0.023 3 ± 0.011 8 | 12.585 9 ± 5.756 8 |

1.2 DNA 提取及序列扩增

取新鲜肌肉组织,经蛋白酶 K 消化后,采用传统的酚-氯仿抽提法提取基因组 DNA。序列扩增引物为 CR-AR: 5'-ACTAC ACGCA ACAAC TCTCA-3' 和 CR-BR: 5'-AATCT TTCTG GATTC TCCTA-3'^[11]。反应总体积为 25 μL,其中包括 10 × PCR Buffer 2.5 μL, dNTP 2 μL, 双向引物各 1 μL, Taq DNA 聚合酶 0.15 μL, 去离子水 17.5 μL。PCR 反应条件为 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 50 s, 45 °C 退火 50 s, 72 °C 延伸 1 min, 循环 35 次; 72 °C 延伸 10 min。扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测,纯化回收后进行双向测序。

1.3 数据分析

测得序列使用 DNASTar 软件包(DNASTAR, Inc., Madison, USA)进行比对分析,并辅以人工校正。运用 Arlequin 3.11^[15]软件统计碱基组成、多态位点数、转换、颠换和插入/缺失等分子多态性指数,并计算单倍型多样性(h)、核苷酸多样性(π)和平均核苷酸差异数(k)。利用 Arlequin 3.11 计算两两群体间的遗传分化指数 F_{st} 值,并进行分子变异分析(AMOVA)、中性检验和核苷酸不配对分布分析。采用 MAGA 4.1^[16]软件基于 Kimura 双参数模型构建单倍型 NJ 系统树,并对系统树中各分支的支持率进行 1 000 次重抽样检验。

2 结果

2.1 序列变异及遗传多样性

本研究 4 个增殖放流亲蟹群体共 301 个个体,扩增得到的目的片段长度约为 600 bp;除去引物和序列前端的 srRNA^[17] 部分序列后,得到长度为 536 bp 的控制区部分序列。其中,C、T、A、G 4 种碱基的平均含量分别为 15.76%、36.37%、37.29% 和 10.58%,A + T 含量(73.66%)明显高于 C + G 含量(26.34%)。在 301 条序列中,共检测到 140 个多态位点,约占总序列长度的 26.12%。这些多态位点共定义了 122 个转换、21 个颠换和 13 个插入缺失。301 个个体中共检测到 155 个单倍型,其中有 20 个单倍型为共享单倍型,其他 135 个单倍型均为群体特有单倍型。

4 个亲蟹群体的单倍型多样性为 0.972 3 ~ 0.993 0,平均为 $0.990 1 \pm 0.001 6$;核苷酸多样性为 0.021 2 ~ 0.023 6,平均为 $0.022 7 \pm 0.011 4$ (表 1)。两者均处于较高水平,且各群体间没有显著差异。

2.2 群体遗传结构与遗传分化

将所有群体视为一个组群进行 AMOVA 分

析,结果显示,98.70% 的遗传差异发生于群体内部($\Phi_{ST} = 0.0130, P = 0.001$)。两两群体间的遗传分化指数 F_{ST} 值为 $-0.002 5 \sim 0.023 0$ (表 2),表明 4 个增殖放流亲蟹群体间的分化程度很低。其中,CY 群体与 KL 群体间的 F_{ST} 值最大,与 HY 群体间的 F_{ST} 值次之,且经 Bonferroni 校正之后,仅这两组统计检验显著($P < 0.05$)。CY 群体与 SG 群体间的 F_{ST} 值最小且为负值,说明两群体间的遗传分化小于群体内的遗传差异。单倍型 NJ 系统树显示,虽然 4 个亲蟹群体形成了多个分支,但每个群体的单倍型都广泛分布在 NJ 系统树中,未形成与各群体相对应的谱系分支(图 2)。

表 2 三疣梭子蟹两两群体间的遗传分化指数 (F_{ST})

Tab. 2 Pairwise F_{ST} between populations of *P. trituberculatus*

| | KL | SG | CY | HY |
|----|----------|----------|----------|----|
| KL | | | | |
| SG | 0.012 9 | | | |
| CY | 0.023 0* | -0.002 5 | | |
| HY | 0.008 3 | 0.013 8 | 0.016 9* | |

注: * 表示差异显著 ($P < 0.05$)

Notes: The asterisks indicate a significant difference ($P < 0.05$)

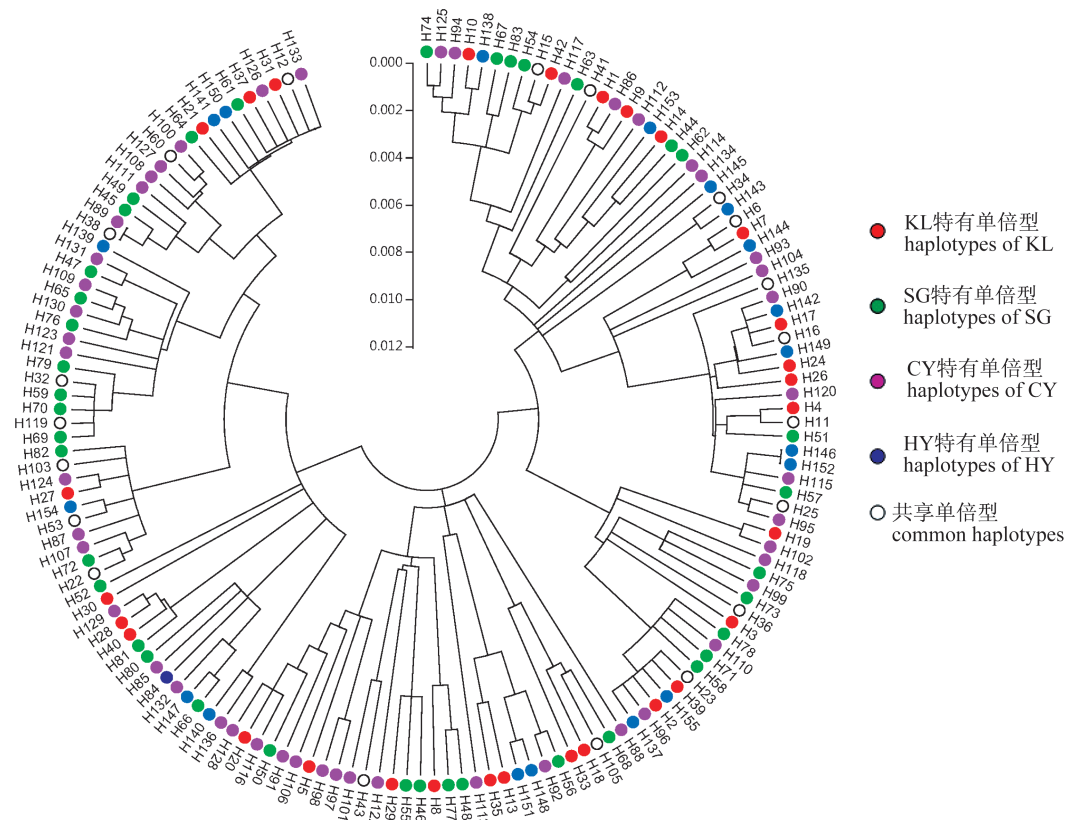


图 2 基于三疣梭子蟹线粒体控制区单倍型构建的 NJ 系统树

Fig. 2 Neighbor-Joining tree constructed by D-loop haplotypes of *P. trituberculatus*

2.3 群体历史动态

本研究所用亲蟹均为海捕野生个体,可用作渤海南部和黄海北部三疣梭子蟹的群体历史动态分析。核苷酸不配对分布分析的结果表明,三疣梭子蟹观测到的核苷酸不配对分布呈双峰类型,其中一个峰对应各群体内的序列差异,另一个峰对应群体间的序列差异;但观测值的分布情况并未明显偏离群体扩张模型下的预期分布(图3)。采用广义非线性最小方差法估算得到的群体扩张参数 τ 值为11.098(95% CI:8.199~17.470)。基于观测值和模拟值间的拟合优度检验结果显示,SSD值和Harpending's Raggedness指数均较小,且统计检验不显著($P>0.05$),表明观测值与模拟值间拟合程度较好,没有显著偏离群体扩张模型。

中性检验结果显示,Tajima's D 为-1.148, Fu's F_s 值为-23.835,两者均统计检验显著($P<0.05$),表明三疣梭子蟹显著偏离中性选择,并曾经历过群体扩张事件,与核苷酸不配对分布分析的结果相一致。

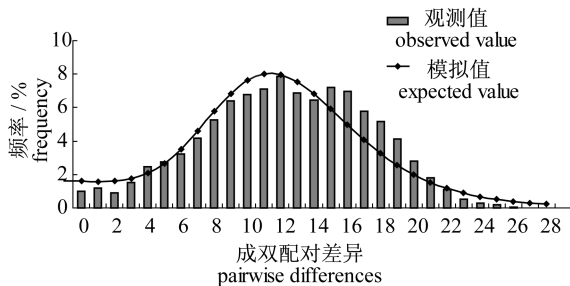


图3 三疣梭子蟹控制区单倍型的核苷酸不配对分布

Fig. 3 The observed pairwise difference (bars), and the expected mismatch distributions under the sudden expansion model (solid line) of control region haplotypes in *P. trituberculatus*

3 讨论

3.1 三疣梭子蟹增殖放流亲蟹遗传多样性分析

遗传多样性是物种生存适应和发展进化的基础,种内遗传多样性越高,则物种对环境适应的能力就越强,进化的潜力也越大^[18]。随着增殖放流项目的开展,大量人工繁育的苗种进入自然海域,若放流群体的遗传多样性显著低于野生群体,则大规模增殖放流很可能会降低放流物种的整体遗

传多样性水平,进而影响到该物种的可持续发展。在增殖放流过程中,放流群体的遗传多样性主要由其亲本决定。若亲本的数量过少、或亲本的遗传多样性状况与野生群体差异显著、或不同亲本的配子对子代的贡献率失衡,则放流群体与野生群体间的遗传差异会增大^[19],而这种差异一般表现为放流群体的遗传多样性低于野生群体。此外,由于适合度与遗传多样性密切相关,放流群体的适合度受其亲本遗传多样性的影响很大^[19]。遗传多样性降低可导致有害隐性基因表达增加、某些优良性状衰退等,进而使群体的适合度发生变化,出现存活率低、繁殖力差、生长缓慢、适应能力弱等问题^[20-21]。如果将适合度低的苗种放入自然海域,放流群体与野生群体间的杂交繁殖会大大提高有害隐性基因在野生群体中出现的频率和表达的可能,在长期作用下甚至会导致物种的退化。因此,为避免产生遗传多样性低、适合度差的放流群体,应尽量选择遗传多样性不低于野生群体的亲本进行苗种繁育,并尽可能增加参与繁殖的亲本数量。

Blankenship等^[22]认为,对亲本和放流群体的遗传监测与管理应当成为增殖放流效果评估的内容之一。本研究利用线粒体控制区部分序列,首次对三疣梭子蟹增殖放流亲蟹的遗传多样性进行了研究。结果显示,4个增殖放流亲蟹群体的单倍型多样性(h)和核苷酸多样性(π)均较高,且与三疣梭子蟹野生群体间没有明显差异^[11,14],表现出丰富的遗传多样性。此外,KL、SG和HY群体随机采自当地外海,保证了亲蟹群体与放流海域野生群体在遗传多样性上的一致性。CY群体虽为异地亲蟹,但其单倍型多样性和核苷酸多样性与采自莱州湾的KL和SG群体间差异不大。由此可见,4个增殖放流亲蟹群体均具有较高的遗传多样性,且与放流海域野生群体间没有明显差异,有利于三疣梭子蟹遗传资源的保护。

此外,通过与其他学者研究结果比较,发现本研究中KL群体的遗传多样性($h:0.9783, \pi:0.0212$)略高于2005年东营群体($h:0.8727, \pi:0.0214$)^[14],而SG群体($h:0.9930, \pi:0.0231$)和CY群体($h:0.9891, \pi:0.0236$)则略低于2006年潍坊群体($h:1.0000, \pi:0.0259$)^[11],但同一地区各群体的年间差异并不大。三疣梭子蟹的大规模增殖放流始于2005年^[2],由此可见,

KL、SG 和 CY 亲蟹的遗传多样性比较贴近放流海域野生群体的原有水平,这对于保护和维持野生群体的遗传多样性具有重要意义。同时,KL 和 SG 群体作为当地海捕亲蟹,表明长期增殖放流并未明显改变莱州湾三疣梭子蟹的遗传多样性状况;这一方面得益于三疣梭子蟹丰富的遗传多样性背景,另一方面也与坚持使用野生抱卵个体作为增殖放流亲蟹有关。

3.2 三疣梭子蟹增殖放流亲蟹群体遗传结构与历史动态分析

国内关于三疣梭子蟹群体遗传分化的研究较多,但其结果却一直存在较大分歧。同样是使用线粒体控制区序列研究三疣梭子蟹的遗传结构,吴惠仙等^[13]认为,中国沿海各海区三疣梭子蟹群体间基因交流广泛,不存在明显的遗传分化,且亲缘关系的远近不以海区划分和地理位置的远近为依据;董志国等^[14]和 Guo 等^[23]则认为,四大海域三疣梭子蟹不同群体间已发生一定程度的分化,但前者认为遗传距离与地理距离间不存在显著的相关性,后者却认为遗传距离与地理距离间呈显著的正相关关系。考虑到以上研究中各群体的数量仅为 10 只左右,样品数量有限可能是实验结果存在分歧的原因之一。

本研究中,两两群体间的 F_{st} 和 AMOVA 分析结果均显示,4 个亲蟹群体间的遗传分化很微弱,NJ 系统树中也未出现与各群体对应的谱系结构。由此可见,5 个亲蟹采集地点(丹东、垦利、昌邑、海阳和日照)的野生群体间未发生明显遗传分化,彼此之间存在广泛基因交流,与吴惠仙等^[13]结果一致。由于三疣梭子蟹具有洄游习性,不同地理群体在越冬场的混合可能是各群体基因交流的途径之一^[24]。但有学者认为,渤海三疣梭子蟹是一个地方性种群,自然条件下与黄海三疣梭子蟹间的交流有限^[25]。虽然这一说法尚未得到实验验证,但考虑到三疣梭子蟹有限的移动能力,垦利和昌邑群体通过洄游离开渤海并绕过山东半岛进入海阳和日照海域的可能性较小。因此,相较于洄游行为,不同地区商品蟹的流通、增殖放流和人工养殖中亲蟹及苗种的异地使用可能是各地理群体间发生基因交流的主要途径^[13,26]。

目前,为使放流群体与野生群体的遗传信息尽量一致,许多学者提倡从放流海域的野生群体中直接采集增殖放流亲本^[27-28]。本研究中,虽然

CY 群体为异地亲蟹,但它与莱州湾野生群体(KL 和 SG)的遗传分化很小,这在一定程度上降低了使用异地亲蟹进行增殖放流的遗传风险。值得注意的是,子代通常携带与亲本生存环境相适应的基因型^[29]。由于日照和丹东海域的生存条件与昌邑地区差异较大,CY 子代某些与环境适应能力密切相关的基因型很可能与放流海域野生群体间存在差异,当其大量进入放流海域后,可能对当地野生群体的遗传组成造成影响。因此,从负责任放流的角度出发,在繁育放流苗种的过程中应尽量避免使用异地亲蟹;同时,有必要在放流海域开展相关的跟踪调查和遗传监测,以进一步研究使用异地亲蟹对野生群体的遗传影响。

群体历史动态分析结果显示,三疣梭子蟹的核苷酸不配对分布与群体扩张模型下的预期分布吻合良好,而 Tajima's D 和 Fu's F_s 值均呈现负值且统计检验显著($P < 0.05$),表明渤海南部和黄海北部的三疣梭子蟹历史上曾发生过群体扩张事件,与 Guo 等^[23] 研究结果基本一致。

总体来说,本研究所分析的 4 个增殖放流亲蟹群体均具有丰富的遗传多样性,且其遗传结构与放流海域的野生群体间没有明显分化,说明种质资源质量较好。但选用种质优良的亲本繁育苗种仅是保证放流群体遗传品质的第一步,苗种繁育过程的某些事件,如亲本产卵量小或孵化率低、高密度养殖条件下苗种互残严重、某些亲本的子代缺乏资源竞争力等,都有可能减少有效亲本的数量,造成放流群体的遗传多样性降低和遗传结构改变^[19]。因此,在选用优质亲本的同时,应结合生产实践适当增加放流亲本的数量、制定合理的繁殖策略并开展放流群体的遗传多样性监测,以确保增殖放流的科学开展,促进资源的保护和可持续发展。

感谢王伟泽(垦利县惠鲁水产养殖有限公司)、李正平(寿光市林海水产育苗场)、王学忠(昌邑市海丰水产养殖有限责任公司)、王忠山(烟台海阳市海洋水产资源增殖站)以及李渊、闫龙等在样品采集中提供的帮助。

参考文献:

- [1] Dai A Y, Yang S L, Song Y Z, et al. Crabs of the China Seas [M]. Beijing: Ocean Press, 1986: 213 - 214. [戴爱云,杨思谅,宋玉枝,等. 中国海洋蟹类.

- 北京:海洋出版社,1986:213-214.]
- [2] Zhang X M, Wang X J, Tu Z, *et al.* Current status and prospect of fisheries resource enhancement in Shandong Province[J]. *Chines Fisheries Economics*, 2009, 27(2): 51-58. [张秀梅, 王熙杰, 涂忠, 等. 山东省渔业资源增殖放流现状与展望. *中国渔业经济*, 2009, 27(2): 51-58.]
- [3] Masuda R, Tsukamoto K. Stock enhancement in Japan; review and perspective[J]. *Bulletin of Marine Science*, 1998, 62(2): 337-358.
- [4] Hamasaki K, Kitada S. A review of kuruma prawn *Penaeus japonicus* stock enhancement in Japan[J]. *Fisheries Research*, 2006, 80(1): 80-90.
- [5] Chen Y Q. Marking methods of juvenile *Portunus trituberculatus* [J]. *Fisheries Science*, 1991, 10(1): 26-28. [陈永桥. 三疣梭子蟹稚蟹标志方法的探讨. *水产科学*, 1991, 10(1): 26-28.]
- [6] Yang F, Xu H T, Dai Z M, *et al.* Molecular characterization and expression analysis of vitellogenin in the marine crab *Portunus trituberculatus* [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2005, 142(4): 456-464.
- [7] Sekino M, Hara M, Taniguchi N. Loss of microsatellite and mitochondrial DNA variation in hatchery strains of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* [J]. *Aquaculture*, 2002, 213(1): 101-122.
- [8] Lind C E, Evans B S, Knauer J, *et al.* Decreased genetic diversity and a reduced effective population size in cultured silver-lipped pearl oysters (*Pinctada maxima*) [J]. *Aquaculture*, 2009, 286(1): 12-19.
- [9] Zhang H, Gao T X, Zhuang Z M, *et al.* Comparative analysis of the mitochondrial control region between the cultured and wild populations of Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2010, 34(8): 1149-1155. [张辉, 高天翔, 庄志猛, 等. 中国对虾养殖群体与野生群体线粒体控制区序列的比较. *水产学报*, 2010, 34(8): 1149-1155.]
- [10] Sbisà E, Tanzariello F, Reyes A, *et al.* Mammalian mitochondrial D-loop region structural analysis: identification of new conserved sequences and their functional and evolutionary implications [J]. *Gene*, 1997, 205: 125-140.
- [11] Feng B B, Li J L, Niu D H, *et al.* Sequence analysis of mitochondrial putative control region gene fragments of wild *Portunus trituberculatus* in four sea regions in China [J]. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 2008, 17(2): 134-139. [冯冰冰, 李家乐, 牛东红, 等. 我国四大海域三疣梭子蟹线粒体控制区基因片段序列比较分析. *上海水产大学学报*, 2008, 17(2): 134-139.]
- [12] Feng B B, Li J L, Niu D H, *et al.* Compared analysis on the sequences of mitochondrial CR gene and CO I gene fragments of nine wild stocks of *Portunus trituberculatus* from the marginal seas of China [J]. *Chinese Journal of Zoology*, 2008, 43(2): 28-36. [冯冰冰, 李家乐, 牛东红, 等. 我国沿海三疣梭子蟹9个野生群体线粒体CR和CO I片段比较分析. *动物学杂志*, 2008, 43(2): 29-36.]
- [13] Wu H X, Xu X N, Xue J Z, *et al.* Analysis of the genetic structure and relationship of the swimming crab, *Portunus trituberculatus* in the coastal area of China [J]. *Journal of Marine Sciences*, 2009, 27(3): 48-53. [吴惠仙, 徐雪娜, 薛俊增, 等. 中国沿海三疣梭子蟹的遗传结构和亲缘关系分析. *海洋学研究*, 2009, 27(3): 48-53.]
- [14] 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. *水产学报*, 2013, 37(9): 1304-1312.]
- [15] 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.
- [16] Tamura K, Dudley J, Nei M, *et al.* MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0 [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, 24(8): 1596-1599.
- [17] Yamauchi M M, Miya M U, Nishida M. Complete mitochondrial DNA sequence of the swimming crab, *Portunus trituberculatus* (Crustacea: Decapoda: Brachyura) [J]. *Gene*, 2003, 311: 129-135.
- [18] Shi L M. Genetic diversity and its conservation [J]. *Bioscience Communication*, 1990, 2(4): 158-164. [施立明. 遗传多样性及其保存. *生物科学信息*, 1990, 2(4): 158-164.]
- [19] Bert T M, Crawford C R, Tringali M D, *et al.* Genetic management of hatchery-based stock enhancement [M] // Bert T M, ed. *Ecological and*

- genetic implications of aquaculture activities. Berlin: Springer Netherlands, 2007: 123 – 174.
- [20] Bert T M, Tringali M D. The effects of various aquacultural breeding strategies on the genetic diversity of successive broods [J]. Journal of Bioscience [Malaysia], 2001, 12 (2): 13 – 26.
- [21] Asahida T, Shinotsuka Y, Saitoh K, *et al.* Parental contributions in a Japanese flounder hatchery inferred from mitochondrial DNA haplotypes [J]. Journal of the World Aquaculture Society, 2004, 35 (2): 199 – 208.
- [22] Blankenship H L, Leber K M. A responsible approach to marine stock enhancement [J]. American Fisheries Society Symposium, 1995, 15: 167 – 175.
- [23] Guo E M, Liu Y, Cui Z X, *et al.* Genetic variation and population structure of swimming crab (*Portunus trituberculatus*) inferred from mitochondrial control region [J]. Molecular Biology Reports, 2012, 39 (2): 1453 – 1463.
- [24] Xue J Z, Du N S, Lai W, *et al.* A review of studies on *Portunus trituberculatus* in China [J]. Donghai Marine Science, 1997, 15 (4): 60 – 65. [薛俊增, 堵南山, 赖伟, 等. 中国三疣梭子蟹 *Portunus trituberculatus* 的研究. 东海海洋, 1997, 15 (4): 60 – 65.]
- [25] Marine Fishery Resources of China Compiling Group. Marine fishery resources of China [M]. Hangzhou: Press of Zhejiang Science and Technology, 1990: 169 – 171. [中国海洋渔业资源编写组. 中国海洋渔业资源. 杭州: 浙江科学技术出版社, 1990: 169 – 171.]
- [26] Sun Q Y, Wang M Q, Su P, *et al.* Genetic diversity and differentiation in mitochondrial ND5 gene of swimming crab *Portunus trituberculatus* [J]. Journal of Dalian Ocean University, 2010, 25 (6): 518 – 522. [孙钦艳, 王敏强, 苏培, 等. 三疣梭子蟹不同地理群体线粒体 DNA ND5 基因序列的变异与分化. 大连海洋大学学报, 2010, 25 (6): 518 – 522.]
- [27] Krueger C C, Gharrett A J, Dehring T R, *et al.* Genetic aspects of fisheries rehabilitation programs [J]. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 1981, 38 (12): 1877 – 1881.
- [28] Hindar K, Ryman N, Utter F. Genetic effects of cultured fish on natural fish populations [J]. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 1991, 48 (5): 945 – 957.
- [29] Lynch M. The genetic interpretation of inbreeding depression and outbreeding depression [J]. Evolution, 1991, 45 (3): 622 – 629.

Genetic diversity of swimming crab (*Portunus trituberculatus*) from four broodstock populations in stock enhancement inferred from mitochondrial control region

YANG Shuang¹, SONG Na¹, ZHANG Xiumei¹, WANG Yunzhong², WANG Sijie², GAO Tianxiang^{1*}

(1. Fisheries College, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

2. Shandong Hydrobios Resources Conservation and Management Center, Yantai 264003, China)

Abstract: *Portunus trituberculatus* is an economically important marine crab distributed along the coast waters of China, Japan, Korea and Malaysia Islands. In recent decades, the wild population has been constantly decreased due to overfishing and habitats destruction. To protect and recover the *P. trituberculatus* resources, a large scale of stock enhancement has been carried out in the coastal waters of China. As the stock enhancement activities may change the genetic variability and genetic composition of the recipient wild populations, it is necessary to carry out genetic monitoring of broodstocks and their offspring for the long-term sustainability of wild populations. In present study, genetic diversity and population structure of 4 *P. trituberculatus* broodstock populations used in stock enhancement were detected according to the sequence of mitochondrial control region. 155 mtDNA haplotypes were observed in 301 *P. trituberculatus* individuals, among which only 20 haplotypes were shared by different populations. The gene diversity index ranged from 0.972 3 to 0.993 0, while the nucleotide diversity index ranged from 0.021 2 to 0.023 6, both of them showed a high level of genetic diversity for broodstock populations. The result of AMOVA suggested that 98.70% of the genetic differentiation occurred within populations. The F_{st} values between populations ranged from -0.002 5 to 0.023 0, which indicated a little genetic differentiation and no significant genealogical structure among 4 populations together with the result of AMOVA. And no pedigree branch corresponding to different populations was observed in the neighbor-joining tree. The results above suggested that wild populations from where the broodstocks were collected had little genetic differentiation between each other. To sum up, each of the 4 broodstock populations had abundant genetic diversity and similar genetic structure with the wild populations to be supplemented, which reflected good quality of the germplasm resource. The mismatch distribution of pairwise nucleotide and the negatively selective neutrality test suggested that *P. trituberculatus* of the south Bohai Sea and north Yellow Sea had experienced demographic or spatial expansion in history.

Key words: *Portunus trituberculatus*; broodstocks; mitochondrial control region; stock enhancement; genetic diversity

Corresponding author: GAO Tianxiang. E-mail: gaozhang@ouc.edu.cn