

# 安徽某淡水龙虾养殖群体分类的分子标记筛选

樊慧敏<sup>①②</sup> 彭开松<sup>①\*</sup> 邹文腾<sup>①</sup> 鲁义善<sup>②</sup> 程起群<sup>③</sup>

① 水产养殖健康与公共卫生实验室, 安徽农业大学动物科技学院 合肥 230036;

② 广东省水生动物健康评估工程技术研究中心, 广东海洋大学深圳研究院 深圳 518120;

③ 农业部东海与海洋渔业资源开发利用重点实验室, 中国水产科学研究院东海水产研究所 上海 200090

**摘要:** 为筛选可用于淡水龙虾养殖群体物种分类的分子标记, 对安徽省某水产养殖有限公司采集的淡水龙虾样本进行了线粒体 *CO I*、16S rDNA、D-loop、*Cyt b* 及 12S rDNA 基因的测序分析, 并与 GenBank 中 30 个滑螯虾属 (*Cherax*) 物种的相应基因序列比对, 同时, 进行上述 5 种分子标记在种内个体间、属内种间、科内属间和目内科间的同源性变异范围比对分析。结果显示, 本研究所采集淡水龙虾样本与四脊滑螯虾 (*C. quadricarinatus*) 的相似性最高, 其中, 1 113 bp 的 *Cyt b* 相似性 100%, *CO I*、16S rDNA 及 12S rDNA 相似性都在 99% 以上; 在以克氏原螯虾 (*Procambarus clarkii*) 为外类群构建的邻接系统发育树中, 本研究样本与四脊滑螯虾聚为一支, 然后与其他物种聚合构成系统树, 确定本研究采集的淡水龙虾样本为四脊滑螯虾; 通过同源性变异范围比对分析, 在淡水龙虾养殖群体的分子分类工作中, 16S rDNA、*Cyt b* 及 12S rDNA 比 *CO I* 和 D-loop 这 2 种分子标记具有较强优势。本研究结果可为今后淡水龙虾养殖场中物种的分类鉴定工作提供参考。

**关键词:** 线粒体基因; 淡水龙虾; 四脊滑螯虾; 分类; 分子标记

**中图分类号:** Q953 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2021) 03-441-08

## Screening of Molecular Markers for Classification in Cultured Population of Freshwater Crayfish in Anhui, China

FAN Hui-Min<sup>①②</sup> PENG Kai-Song<sup>①\*</sup> ZOU Wen-Teng<sup>①</sup> LU Yi-Shan<sup>②</sup> CHENG Qi-Qun<sup>③</sup>

① *Laboratory of Aquatic Health and Public Health, College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036;*

② *Guangdong Provincial Engineering Research Center for Aquatic Animal Health Assessment, Shenzhen Institute of Guangdong Ocean*

*University, Shenzhen 518116;* ③ *Key Laboratory of East China Sea and Oceanic Fishery Resources Exploitation and Utilization, Ministry of Agriculture, East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090, China*

**Abstract:** An experiment was conducted to screen molecular markers that can be used for classification of populations of cultured freshwater crayfish samples collected in Anhui, China. After genome extracting, PCR

**基金项目** 安徽省现代农业产业技术体系项目 (皖农科[2016]84 号), 安徽省重点研究与开发计划项目 (No. 1704g07020123), 广东省现代农业产业体系专项资金 (No. 2019KJ141);

\* 通讯作者, E-mail: kaisongpeng@ahau.edu.cn;

**第一作者介绍** 樊慧敏, 女, 硕士; 研究方向: 水生生物遗传育种与病害学研究; E-mail: 553891740@qq.com。

收稿日期: 2020-09-29, 修回日期: 2021-01-26 DOI: 10.13859/j.cjz.202103014

amplifying and sequencing of *CO I*, 16S rDNA, D-loop, *Cyt b* and 12S rDNA of the samples were performed, and the neighbor-joining phylogenetic tree and genetic distance in MEGA6.06 were used to compare the samples with 30 species recorded in GenBank. The reliability of neighbor-joining phylogenetic tree was tested by 1 000 times bootstrap and the genetic distance was calculated based on kimura-2-parameter nucleotide substitution model. In the neighbor-joining phylogenetic tree (Fig. 1) constructed with *Procambarus clarkii* as an outgroup, the samples first clustered together with red claw crayfish (*Cherax quadricarinatus*) and then constituted a relationship to other species, strongly showing that the samples should be classified as *C. quadricarinatus*. The genetic distance range (Table 3) showed that the average genetic distances of 16S rDNA, *Cyt b* and 12S rDNA were increasing from intraspecific individual to intra order interfamily, and were not at the same level, so that they can probably be better used in cultured population. The results from this paper will benefit the people working in the crayfish farm, and provide reference for classification of freshwater crayfish in the future.

**Key words:** Mitochondrial DNA; Australian freshwater crayfish; *Cherax quadricarinatus*; Classification; Molecular markers

淡水龙虾广泛分布于世界各地, 在中国主要指拟螯虾科 (Parastacidae) 的澳洲淡水龙虾 (Australian freshwater crayfish) 和螯蛄科 (Cambaridae) 的克氏原螯虾 (*Procambarus clarkii*)。澳洲淡水龙虾是分布于澳大利亚及周边地区的滑螯虾属 (*Cherax*) 的俗称, 有 100 多种, 为世界名贵经济虾类 (Munasinghe et al. 2004)。该虾类由于个头大、增长快、抗病性强, 市场潜力大 (Masser et al. 1997, Saoud et al. 2013), 已在世界各地推广养殖。其中的马龙滑螯虾 (*C. cainii*)、牙别滑螯虾 (*C. destructor*) 和四脊滑螯虾 (*C. quadricarinatus*) 已于 1992 年经湖北引进我国 (李继勋 2000), 在广东省试养并取得种苗人工繁殖和成虾养殖试验成功, 之后在国内各地陆续推广养殖 (武平等 2001)。澳洲淡水龙虾体型较为相似, 在形态学方面主要从体色进行区分, 但其体色除受基因影响外, 温度和养殖水体的酸碱度及无机盐浓度等环境因子对其影响也很大 (张志山等 2013), 因而无法从形态学进行准确分类。

物种的分类研究通常使用核 DNA (nuclear DNA, nDNA) 或线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 序列作为分子标记。mtDNA 与 nDNA 相比, 具有分子结构简单、母系遗传、

不重组和进化速度快等优点 (Xu et al. 2014)。近年来, mtDNA 的不同基因序列广泛应用于水生动物分类进化等研究领域 (Perdices et al. 2005), 目前常用 *CO I*、16S rDNA、D-loop、*Cyt b* 及 12S rDNA 等基因序列作为分子标记 (Guo et al. 2005, Itoi et al. 2007), 如基于 *CO I* 基因序列对弹涂鱼类系统进化关系的研究 (张顺等 2017), 基于 16S rDNA、*Cyt b*、12S rDNA 和 ATP 酶 8/6 基因序列对大鳞突吻鱼 (*Varicorhinus macrolepidotus*) 分类和进化的研究 (曲晓娟等 2017), 以及基于 D-loop 基因序列对河北 3 个日本沼虾 (*Macrobrachium nipponense*) 野生群体基因序列变异及种群遗传结构分析的研究 (董新培等 2017) 等。研究显示, 从单个 mtDNA 分子标记中获得的遗传信息有限而偏颇, 而使用多个分子标记可以提高研究的分辨力 (Gruenthal et al. 2007, Krück et al. 2013)。

本实验以采集于安徽省某水产养殖有限公司的淡水龙虾样本为研究对象, 进行了线粒体 *CO I*、16S rDNA、D-loop、*Cyt b* 及 12S rDNA 基因序列的测序分析, 并与 GenBank 中相应基因序列比对, 确定该样本所属物种。同时, 比对 5 种分子标记在种内个体间、属内种间、科

内属间和目内科间的同源性变异范围, 以期为淡水龙虾的物种分类以及养殖群体内分子标记的筛选积累资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 样本采集

本研究中 7 尾淡水龙虾个体样本均采集于安徽省某水产养殖有限公司, 均为养殖群体的亲虾, 其中样本 1、2 个体与另外 5 尾样本 3~7 个体分属 2 个不同养殖群体。活体运回实验室, 冰上 10 min 安乐死, 取肌肉组织于 95%乙醇固定备用。

### 1.2 物种的 DNA 分子鉴定

**1.2.1 引物设计** 根据目前国内引进澳洲淡水龙虾的现状, 于 GenBank 下载马龙滑螯虾、

牙别滑螯虾和四脊滑螯虾 3 种滑螯虾属物种的线粒体基因组序列, 分别用 Oligo 7 软件设计扩增相应基因序列的引物 (表 1)。

**1.2.2 DNA 提取** 在液氮中粉碎样本组织 (Prentis et al. 2014), 参考《分子克隆实验指南》(萨姆布鲁克等 2008) 的酚/氯仿抽提法, 使用 Ezup 柱式动物基因组 DNA 抽提试剂盒 [生工生物工程 (上海) 股份有限公司] 提取样本全 DNA 作为模板, -20 °C 保存备用。

**1.2.3 PCR 分析** PCR 反应体系为 20  $\mu$ l: 2  $\times$  Pfu PCR Master Mix (Dye Plus) (北京普鲁顿生物科技有限公司) 10  $\mu$ l, 10  $\mu$ mol/L 正反引物各 1  $\mu$ l, 10 ng DNA 模板 2  $\mu$ l, 其余 ddH<sub>2</sub>O 补足。反应条件为: 95 °C 预变性 3 min; 95 °C 变性 10 s, 60 °C 退火 15 s, 72 °C 延伸 1 min,

表 1 参考物种的线粒体基因及克隆引物

Table 1 Mitochondrial genes and primers for cloning of reference species

物种 Species	GenBank 序列号 GenBank accession	基因 Genes	引物 (5'~3') Primer	预期片段大小 (bp) Expected fragment
四脊滑螯虾 <i>Cherax quadricarinatus</i>	NC_022937.1	CO I	CAAATCATAAAGACATCGGTACTC CAATGGACGAAGGTAGGAAGGT	1 449
		16S rDNA	AATAACCTCTGACTCCTTAGAAG TTGGTTGTTATGAAGACTTGCTA	1 254
		D-loop	TACAAATCTCCCATCCTCCTTA GGTGCATCCAATTTACATAAAG	882
		Cyt b	ATGACTTCGCCTTTACGTAAATC AGGGTAGCCAAAGGGTCAGTA	1 112
		12S rDNA	CACCTACTATGTTACGACTTATTC CTACTTGAATAGGTTGAGATAGG	816
马龙滑螯虾 <i>C. cainii</i>	NC_026559.1	CO I	GCAACGATGGTTATTCTCAACAAA GGGAGGATAAGGGTGTGTCA	1 492
		16S rDNA	CCGGTCTGAACTCAAATCATGT TTGGCGATAGATGAAAGTACTGT	1 139
		D-loop	CTTAATTGTAACGACCACCAGAA GGATGAGGAGAAGGGCACTAAA	932
		Cyt b	GATCACTCCTAGGGCTATGTC GGGTTTGTCTGTGATGATATAG	960
		12S rDNA	TAACAAATGCCACACCAACCAAAA TGTGATTAGAATGGGTAGAGTTC	1 179
牙别滑螯虾 <i>C. destructor</i>	NC_011243.1	CO I	ATAGTGGGCACCTCATTAAAGATT GTTGGAGATTAGTGGATTCTG	1 458
		16S rDNA	CTACTAAACCAACAGAACTCT CTAGCATTTCACTTACGTTGAGAA	1 491
		D-loop	TCAACTGTGACAAACCTTCTCAA AATGAGGTATGAGCCATTAGC	1 135
		Cyt b	CCCAAGGAATATCTCAACTTTATG TAGTAGGAGAAATAGAGGAGAGT	1 017
		12S rDNA	AAGTAAITCTAGGTGCACCTTCC GCTCCTACTTGATTAGTTCTATC	970

35 个循环; 72 °C 延伸 5 min。产物进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 纯化回收并连接 TOPO-T 载体(北京普鲁顿生物科技有限公司)转化, 筛选阳性克隆送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

### 1.3 数据处理

本研究所获得样本的 *CO I*、16S rDNA、D-loop、Cyt *b* 及 12S rDNA 基因序列, 全部使用 LaserGene 软件包中的 Seqman 进行拼接、比对, 并辅以人工校正, 然后通过 NCBI 的 BLAST 检索系统进行序列同源性分析。使用 MEGA6.06 (Tamura et al. 2013), 选取原螯虾属 (*Procambarus*) 的克氏原螯虾 (*P. clarkii*) 为外群, 结合从 GenBank 中下载的 29 个滑螯虾属物种的相应基因序列, 构建邻接系统发育树, 系统树分支的可靠性由 1 000 次 bootstrap 来检验; 基于 Kimura-2-parameter (Kimura 1980) 核苷酸替代模型计算样本与四脊滑螯虾 (NC\_022937.1) 的遗传距离, 并与 Hebert 等 (2003) 所推荐的物种鉴定最小种间遗传距离 (0.020) 相比较。

同时, 选取 GenBank 中已有的与样本同种异体、同属异种、同科异属和同目异科的参考物种数据, 分别为滑螯虾属的四脊滑螯虾 (NC\_022937.1) 与马龙滑螯虾 (NC\_023559.1)、拟螯虾科刺螯虾属的 *Euastacus yarraensis* (NC\_023811.1) 和十足目腹胚亚目螯虾下目螯蛄科原螯虾属的克氏原螯虾

(NC\_016926.1), 与样本分别进行 *CO I*、16S rDNA、D-loop、Cyt *b* 及 12S rDNA 基因序列在种内个体间、属内种间、科内属间和目内科间的同源性变异范围分析, 比较并筛选可用于淡水龙虾养殖群体物种分类的分子标记。

## 2 结果

### 2.1 线粒体基因序列特征

本研究获得的淡水龙虾样本 *CO I*、16S rDNA、D-loop、Cyt *b* 及 12S rDNA 基因片段产物平均长度分别为 1 451、1 254、883、1 113 及 817 bp, 各基因片段核苷酸组成见表 2。

### 2.2 各组群体系统发育分析

7 个样本 *CO I*、16S rDNA、D-loop、Cyt *b* 及 12S rDNA 基因的 BLAST 比对显示, 所有样本与四脊滑螯虾同源相似性最高, 其中, Cyt *b* 相似性为 100%, *CO I*、16S rDNA 及 12S rDNA 相似性都在 99% 以上。分别利用 *CO I*、16S rDNA、D-loop、Cyt *b* 及 12S rDNA 基因序列, 以克氏原螯虾为外类群, 对本研究中 7 个样本和 GenBank 中已有的 29 个滑螯虾属物种构建邻接系统发育树。5 种分子标记所建立的系统树具有类似的系统发育拓扑结构。图 1 为基于 12S rDNA 所构建的系统树结构, 其中, 7 个样本和四脊滑螯虾聚为一支, 然后与其他 29 个物种构成系统树。基于本研究中线粒体 DNA 序列分子系统进化的分析表明, 本研究的淡水龙虾样本均为四脊滑螯虾。

表 2 样本各基因序列碱基组成

Table 2 Base composition of each gene sequence in the samples

基因 Genes	GenBank 序列号 GenBank accession	碱基的平均含量 Average base content (%)					
		A	T	C	G	A+T	C+G
<i>CO I</i>	MH932577 - MH932583	32.0	26.8	16.7	24.4	58.8	41.1
16S rDNA	MG199588、MH919311 - MH919314、MH919316、MH919317	32.6	35.7	9.4	22.3	68.3	31.7
D-loop	MK116521、MK124611、MK135437、MK142781、MK156782、MK176336、MK189208	31.0	20.8	20.4	27.8	51.8	48.2
Cyt <i>b</i>	MH990613 - MH990619	23.9	35.0	26.6	14.5	58.9	41.1
12S rDNA	MG199589、MH916569、MH916570、MH916573、MH916574、MH916576、MH916579	32.5	32.1	22.0	13.4	64.6	35.4

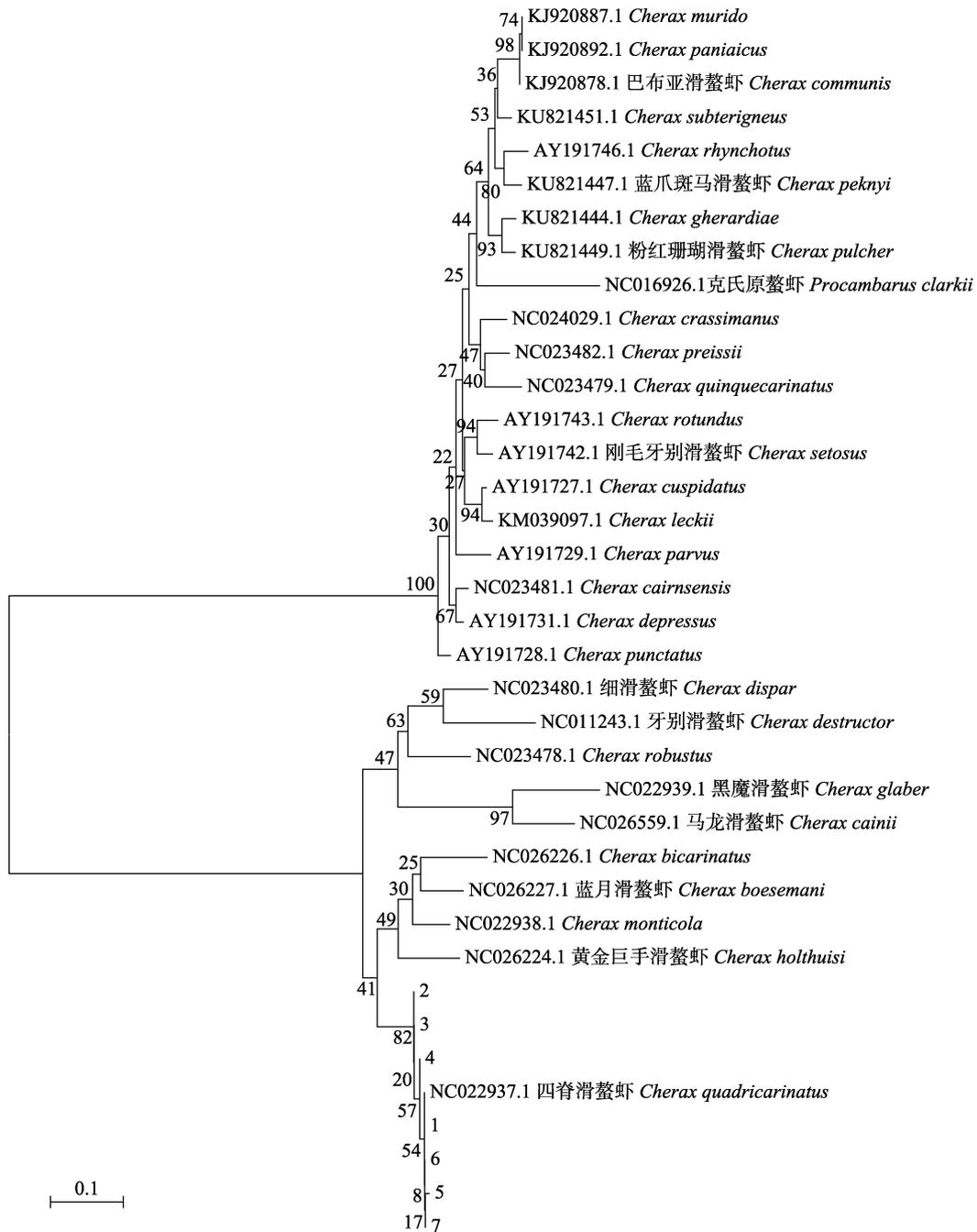


图 1 基于线粒体 12S rDNA 编码基因构建的淡水龙虾邻接系统发育树

Fig. 1 Neighbor-joining phylogenetic tree based on mitochondrial 12S rDNA coding genes in crayfish *Cherax*

图中 1~7 表示 1~7 号样本。1 - 7 represent samples 1 - 7.

同时，基于 Kimura-2-parameter 核苷酸替代模型，对 7 个样本及四脊滑螯虾（NC\_022937.1）的 *CO I*、16S rDNA、D-loop、Cyt *b*

及 12S rDNA 序列分别进行两两比对的同源性计算，样本与四脊滑螯虾（NC\_022937.1）的同源性范围见表 3。

表 3 参考物种及样本基因的平均遗传距离

Table 3 The mean genetic distance of 5 genes of reference species and samples

		CO I	16S rDNA	D-loop	Cyt b	12S rDNA
种内个体间 Intraspecific individual	范围 Range	0.001 - 0.009	0.003	0.003 - 0.008	0.001 - 0.013	0.003 - 0.005
	平均 Mean	0.005	0.003	0.006	0.006	0.004
属内种间 Intragenus interspecies	范围 Range	0.291 - 0.297	0.247	2.015 - 5.563	0.186 - 0.191	1.393 - 1.523
	平均 Mean	0.251	0.247	3.271	0.188	1.481
科内属间 Intrafamily intergenus	范围 Range	0.597 - 0.623	0.329	10.049 - 12.880	0.541 - 0.563	21.842 - 22.053
	平均 Mean	0.609	0.329	11.279	0.551	21.880
目内科间 Intraorder interfamily	范围 Range	0.665 - 0.688	1.613	12.605 - 15.101	8.029 - 8.095	192.304 - 192.421
	平均 Mean	0.675	1.613	13.662	8.074	192.363

表中种内个体间、属内种间、科内属间和目内科间分别指样本与四脊滑螯虾、马龙滑螯虾、*Euastacus yarraensis* 和克氏原螯虾数据间的比较。

The intraspecific individual, intragenus interspecies, intrafamily intergenus and intraorder interfamily referred to the data comparison between the samples and *Cherax quadricarinatus*, *C. cainii*, *Euastacus yarraensis* as well as *Procambarus clarkia*.

### 2.3 5 种分子标记在同源性评价方面的比较

本研究的 7 个样本与四脊滑螯虾 (NC\_022937.1) 间的 5 种分子标记的种内个体间平均遗传距离为 0.003~0.006 (表 3), 均低于物种鉴定最小种间遗传距离 (0.020), 而属内种间、科内属间和目内科间的平均遗传距离均高于 0.020。

## 3 讨论

淡水龙虾在水产养殖中的经济地位日益重要, 然而, 目前尚不清楚澳洲淡水龙虾首次引进中国以及推广后各地的具体物种情况; 而且, 在进口种虾和虾苗时, 对种虾公司所提供的产品无法直接获得相关的遗传背景数据, 因此, 提供目前可用于研究该产业的遗传资源状况的基础数据非常重要。

本研究初步分析并比较了 2 个不同淡水龙虾养殖群体亲本的线粒体 CO I、16S rDNA、D-loop、Cyt b 及 12S rDNA 基因序列的特征及同源性差异。在本研究 5 种分子标记的碱基组成中, 平均 A + T 含量明显高于 C + G 含量, 这样的核苷酸组成模式在其他水生生物 (包括虾类) 的研究中广泛报道 (Kontula et al. 2003, 董鑫等 2015), 而且, 在各个片段的比对中,

都发现一些不同水平的插入和缺失, 该结果与其他虾类的研究结果相似。从原核生物到真核生物, 其基因组中碱基偏向性现象广泛存在, 且不同物种间碱基的不均衡程度也各不相同。这一现象的产生可能与基因的表达水平、翻译起始效应、碱基组分、基因长度以及密码子与反密码子间结合能力的大小有关 (Perna et al. 1995, 武伟等 2007)。

分子系统发育分析是从分子和进化水平解释动物分类地位的主要研究方法。基于线粒体 DNA 序列的分子系统学分析, 在序列同源性构建的邻接系统发育树中, 本研究所采集的 7 个样本和四脊滑螯虾明显聚为一支, 即样本均鉴定为四脊滑螯虾。而克氏原螯虾和 GenBank 中已有的一部分研究相对较少的滑螯虾属物种聚为一支, 养殖、研究较多的马龙滑螯虾、牙别滑螯虾和四脊滑螯虾等反而与这些研究较少的滑螯虾属物种的亲缘关系较远。在所构建的系统树中, 很多支的支持率都低于 50, 其中一些支的支持率甚至低于 10。这种现象是否由于分类学差异造成还待进一步研究。

短暂的隔离作用、较低的基因流及分化时间的早晚等都可能影响遗传分化差异。与其他相关报道相比 (He et al. 2012), 本研究中样本

的同源性差异较小。从 5 种分子标记的平均遗传距离计算结果比较可知, *CO I*、16S rDNA、D-loop、*Cyt b* 及 12S rDNA 基因序列均具有足够大的种间差异, 以区分各物种。同时, 因 16S rDNA、*Cyt b* 及 12S rDNA 在种内个体间、属内种间、科内属间和目内科间的平均遗传距离均呈递增趋势, 且遗传距离均不在同水平级别上, 对比 *CO I* 和 D-loop 2 种分子标记, 可在属内种间及科内属间进行较好区分, 在淡水龙虾鉴定比较工作上更有优势, 并能更好地分析同种不同地理群个体之间的遗传多样性, 为不同地理群间种质交流提供参考。

## 参 考 文 献

- Gruenthal K M, Acheson L K, Burton R S. 2007. Genetic structure of natural populations of California red abalone (*Haliotis rufescens*) using multiple genetic markers. *Marine Biology*, 152(6): 1237–1248.
- Guo X, He S, Zhang Y, et al. 2005. Phylogeny and biogeography of Chinese sisorid catfishes reexamined using mitochondrial cytochrome b and 16s rRNA gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 35(1): 344–362.
- He L, Xie Y N, Lu W, et al. 2012. Genetic diversity in three redclaw crayfish (*Cherax quadricarinatus*, von Martens) lines developed in culture in China. *Aquaculture Research*, 43(1): 75–83.
- Hebert P D N, Cywinska A, Ball S L, et al. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 270(1512): 313–321.
- Ito S, Saito T, Washio S, et al. 2007. Speciation of two sympatric coastal fish species, *Girella punctata* and *Girella leonina* (Perciformes, Kyphosidae). *Organisms, Diversity and Evolution*, 7(1): 12–19.
- Kimura M J. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16(2): 111–120.
- Kontula T, Kirilchik S V, Väinölä R. 2003. Endemic diversification of the monophyletic cottoid fish species flock in Lake Baikal explored with mtDNA sequencing. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 27(1): 143–155.
- Krück N C, Tibbetts I R, Ward R D, et al. 2013. Multi-gene barcoding to discriminate sibling species within a morphologically difficult fish genus (*Sillago*). *Fisheries Research*, 143(6): 39–46.
- Masser M P, Rouse D B. 1997. Australian red claw crayfish. *Southern Regional Aquaculture Center*, 244(4): 1–8.
- Munasinghe D H N, Burrige C P, Austin C M. 2004. Molecular phylogeny and zoogeography of the freshwater crayfish genus *Cherax* *Erichson* (Decapoda: Parastacidae) in Australia. *Biological Journal of the Linnean Society*, 81(4): 553–563.
- Perdices A, Sayanda D, Coelho M M. 2005. Mitochondrial diversity of *Opsariichthys bidens* (Teleostei, Cyprinidae) in three Chinese drainages. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 37(3): 920–927.
- Perna N T, Kocher T D. 1995. Patterns of nucleotide composition at fourfold degenerate sites of animal mitochondrial genomes. *Journal of Molecular Evolution*, 41(3): 353–358.
- Prentis P J, Pavasovic A. 2014. The *Anadara trapezia* transcriptome: a resource for molluscan physiological genomics. *Marine Genomics: Part B*, 18: 113–115.
- Saoud I P, Ghanawi J, Thompson K R, et al. 2013. A review of the culture and diseases of redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus* (von Martens 1868). *Journal of the World Aquaculture Society*, 44(1): 1–29.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, et al. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12): 2725–2729.
- Xu H, Zhang Y, Xu D, et al. 2014. Genetic population structure of miiuy croaker (*Miichthys miiuy*) in the Yellow and East China Seas base on mitochondrial COI sequences. *Biochemical Systematics and Ecology*, 54(2): 240–246.
- 董新培, 武小斌, 万海付, 等. 2017. 河北 3 个日本沼虾野生群体线粒体 DNA D-loop 基因序列变异及种群遗传结构分析. *水产学报*, 41(02): 182–188.
- 董鑫, 邢坤, 隋宥珍, 等. 2015. 基于线粒体 COI 基因序列的 4 个海域口虾蛄群体的遗传多样性研究. *海洋科学*, 39(7): 29–36.
- 李继勋. 2000. 淡水虾繁育与养殖技术. 北京: 金盾出版社.
- 曲晓娟, 李昭燕, 宋倩, 等. 2017. 基于线粒体 DNA 序列分析研究泰山赤鳞鱼的分类和进化. *山东理工大学学报: 自然科学版*, 31(05): 18–23.

- 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W, 格林 M R, 等. 2008. 分子克隆实验指南精编版. 北京: 化学工业出版社.
- 武平, 王中乾, 韩瑞杰, 等. 2001. 澳洲淡水龙虾人工繁殖技术的研究. *淡水渔业*, 31(4): 32-33.
- 王伟, 刘洪斌, 张泽, 等. 2007. 节肢动物线粒体基因组碱基组成特征分析. *生物信息学*, 5(3): 102-105.
- 张顺, 廖健, 郭昱嵩, 等. 2017. 基于线粒体 *cox1* 基因序列的弹涂鱼类系统进化关系. *广东海洋大学学报*, 37(1): 21-27.
- 张志山, 安丽, 孟庆磊, 等. 2013. 克氏原螯虾和红螯虾的形态差异及判别分析. *齐鲁渔业*, 30(8): 7-10.