



安徽地区克氏原螯虾群体的遗传多样性和遗传结构

崔文涛¹, 邹宇凡¹, 白志毅^{1,2*}, 王志炎¹, 李典中³

(1. 上海海洋大学, 农业农村部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306;

2. 上海海洋大学, 上海市水产养殖工程技术研究中心, 上海 201306;

3. 芜湖盛典休闲生态园有限公司, 安徽 芜湖 241200)

摘要: 为了解安徽地区克氏原螯虾养殖群体的遗传多样性, 实验以安徽芜湖 (WH)、宣城 (XC)、合肥 (HF) 3 个地区克氏原螯虾人工养殖群体为研究对象, 分别以安徽铜陵 (TL)、马鞍山 (MAS) 2 个野生群体和监利 (JL)、建湖 (JH)、涌湖 (GH)、兴化 (XH) 4 个人工养殖群体作为对照, 选用 10 对克氏原螯虾微卫星引物对其进行微卫星遗传多样性和遗传结构研究。结果显示, 安徽地区人工养殖克氏原螯虾群体的平均遗传多样性均高于 2 个野生群体和江苏、湖北 4 个地区的人工养殖群体, 其中 XC 群体的遗传多样性最高。9 个群体全部 10 个位点经 Bonferroni 法校正后均显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡且绝大多数位点显示杂合不足。AMOVA 分析表明遗传变异是由群体内部决定的; 大多数组的 F_{st} 表现出中度分化 ($0.05 < F_{st} < 0.15$)。基因流表明不同群体之间存在着广泛的基因交换, 尤其是 GH 和 JH 群体之间。基于群体间 Nei 氏遗传距离及 UPGMA 聚类树结果显示, WU、GH、MAS 和 JH 群体聚为一组, XC 和 HF 群体同属于一组, 而 JL、TL 和 XH 群体分别自成一组。STRUCTUR 结果显示, XC 和 HF 群体的大多数个体被分配到相同的遗传群中, 说明上述群体起源相同。研究表明, 安徽地区克氏原螯虾人工养殖群体具有较高的遗传多样性。实验结果可为安徽地区克氏原螯虾种质资源的保护和改良提供参考资料。

关键词: 克氏原螯虾; 遗传多样性; 遗传结构; 微卫星

中图分类号: Q 347; S 966.12

文献标志码: A

生物的遗传多样性主要体现在不同个体或群体间 DNA 和蛋白质序列的遗传距离和差异上, 其不受时间的推移而增加, 主要受限于功能和表观遗传的复杂性^[1]。遗传多样性通常通过限制性片段长度多态性 (RFLP)、扩增片段长度多态性 (AFLP)、随机扩增多态 DNA (RAPD)、微卫星 (SSR) 和单核苷酸多态性 (SNP) 等分子标记来评估, 微卫星也称为 SSRs, 是一种在真核生物基因组中具有高度变异的简单重复 DNA 序列^[2]。由于其符合孟德尔的遗传规律, 具有高度多态, 共显性,

且高度可复制, 易于操作^[3]等优点, 因此, 通过 SSR 获得的遗传多样性数据可用于调查的物种遗传变异性, 且为防止物种的遗传多样性随着时间推移而丧失提供了理论参考^[4]。SSRs 也被广泛应用于水产动物的遗传连锁图谱构建、数量性状基因座 (QTL) 作图、群体遗传分析、亲子鉴定和分子标记辅助选择 (MAS) 等^[5-6]。

克氏原螯虾 (*Procambarus clarkii*) 俗称淡水龙虾, 其具有适应性广、繁殖力强、生长快、肉质鲜美及营养丰富等特点, 广受国内外养殖者和消

收稿日期: 2021-08-18 修回日期: 2022-01-19

资助项目: 安徽农业生产发展项目; 九江市第七批“双百双千”人才工程 (JJSZF-201912-2959571)

第一作者: 崔文涛 (照片), 从事水产动物遗传育种研究, E-mail: 2351402518@qq.com

通信作者: 白志毅, 从事水产动物遗传育种研究, E-mail: zybai@shou.edu.cn



费者青睐。克氏原螯虾原产于美国东南部和墨西哥东北部^[7], 后经日本引入我国^[8], 已在我国各地广泛分布并形成了不同的地理种群。国外学者均已先后对其国内克氏原螯虾的种群扩散过程、机制和种群遗传结构的做了大量研究工作^[9-11]。在国内, Yue等^[12]等利用微卫星标记分析了6个地区的克氏原螯虾遗传多样性和种群结构。李艳和^[13]对我国的35个群体以及1个美国种群、1个日本种群进行群体遗传多样性和种群遗传结构分析。邢智珺等^[14]分析了江苏8个克氏原螯虾群体遗传多样性和遗传结构。上述研究结果表明, 尽管我国克氏原螯虾遗传多样性低于美国、日本群体, 但整体遗传多样性水平较高。

克氏原螯虾的稻虾种养面积、水产品产量分别占全国稻渔综合种养总量的47.70%和60.84%, 为最大规模的稻渔综合种养模式^[15]。根据《中国小龙虾产业发展报告(2020)》^[16], 2019年安徽地区的克氏原螯虾产量达34.98万t, 位居全国第二。随着我国克氏原螯虾养殖规模扩大, 成虾规格、品质带来的市场价格差距加剧了养殖业的竞争。而克氏原螯虾养繁一体的养殖模式及捕大留小的苗种供给方式, 不利于亲本留种和良种选育, 导致克氏原螯虾种质的衰退及抗病力低等问题, 严重制约着我国克氏原螯虾养殖业的进一步发展^[17]。目前对安徽地区克氏原螯虾养殖群体的遗传多样性评估鲜有报道, 因此有必要对安徽克氏原螯虾养殖群体进行遗传多样性的评估。本研究利用10对微卫星标记分子对安徽(3个人工养殖群体和2个野生群体)、湖北(1个人工养殖群体)和江苏(3个人工养殖群体)共9个克氏原螯虾群体的遗传结构进行分析, 旨在了解安徽不同地区人工养殖的克氏原螯虾群体间的遗传差异, 为生产养殖提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 样品采样和DNA的提取

2020年分别采集了芜湖(WH)、宣城(XC)、合肥(HF)、监利(JL)、建湖(JH)、涸湖(GH)、兴化(XH)7个地区的稻渔综合种养示范区人工养殖群体和铜陵(TL)、马鞍山(MAS)2个地区的野生群体(图1), 共270尾克氏原螯虾样品用于实验研究。将所有克氏原螯虾的尾壳去除, 露出白色肌肉, 然后收集肌肉组织, 并用无水乙醇固定, 然后按照制造商的说明, 使用海洋动物组织基因组

试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司]进行总DNA提取, 利用分光光度计测定其浓度和纯度, 并于-20℃低温冰箱中保存备用。本研究获得了上海海洋大学实验动物管理和使用伦理委员会批准(SHOU-DW-2019-003), 实验过程中操作人员严格遵守上海海洋大学伦理规范, 并按照上海海洋大学伦理委员会制定的规章制度执行; 所有实验均按照当地的研究动物使用准则进行, 并经伦理委员会批准。

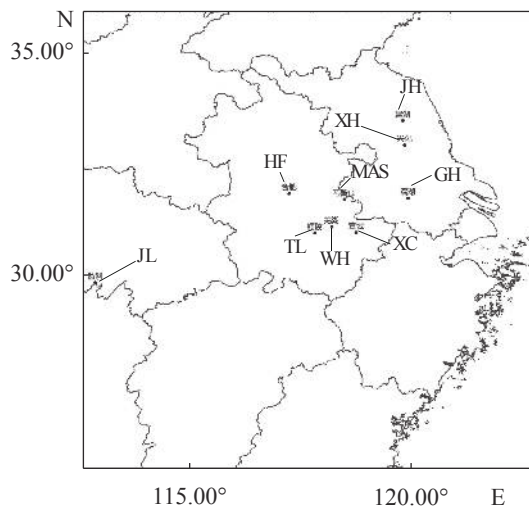


图1 9个克氏原螯虾群体采样地点

JL. 监利群体, JH. 建湖群体, GH. 涸湖群体, XH. 兴化群体, TL. 铜陵群体, MAS. 马鞍山群体, WH. 芜湖群体, XC. 宣城群体, HF. 合肥群体; 下同。

Fig. 1 Sampling sites of 9 *P. clarkii* populations

JL. Jianli populations, JH. Jianhu populations, GH. Gehu populations, XH. Xinghua populations, TL. Tongling populations, MAS. Maanshan populations, WH. Wuhu populations, XC. Xuancheng populations, HF. Hefei populations; the same below.

1.2 引物的合成

为了节约实验成本, 本研究参照了Schuelke^[18] TP-M13-SSR技术, 把M13正向引物的5'端带上荧光标记(表1), 选用10对已发表、扩增条件较好、多态性高的克氏原螯虾SSR引物^[10, 14, 19]的反

表1 5'端带有荧光标记的M13正向引物及序列

Tab. 1 The M13 forward primer fluorescent-labelled at 5'end		
引物名称 primer names	标记荧光 fluorescent labelled	引物序列(5'-3') primer sequences
M13-B	FAM	5'FAM-CACGACGTTAAACGAC-3'
M13-G	VIC	5'VIC-CACGACGTTAAACGAC-3'
M13-Y	NED	5'END-CACGACGTTAAACGAC-3'

向引物和 M13 引物相连作为 M13-SSR 的正向引物, 其正常的正向 SSR 引物作为 M13-SSR 的反向引物 (表 2); M13-SSR 引物及 5'端带有荧光标记

的 M13 正向引物引物均由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。

表 2 克氏原螯虾 10 对微卫星引物

Tab. 2 Primers of 10 microsatellites in *P. clarkii*

位点 locus	引物序列 primer sequences	退火温度/°C annealing temperature	重复类型及次数 repeat motif and times	片段大小/ bp size
PeIG02	F: M13-TGGCGAATTTTGCCTGTTTCTGTC R: CTCCCCATGCACTCTGGCTCTGT	56	(GATA) ₃ GAGAA(GATA) ₅	216~224
PCL33	F: M13-ACAACAACTGCAACTCATTCTA R: ACTCCTGTCCCATTTCACTAC	56	(TG) ₃₀	132~158
PCL29	F: M13-GTCTTCTCTCCCCATTTCTCAC R: FAM-CACTCAAGCCTGCCCTCACTC	56	(GA) ₂₇	170~214
PCL02	F: M13-ATCAAATCAAACGAAGCAAGAAAG R: GAAGACGGGACACCACGAG	56	(TG) ₃₀	245~271
PCL28	F: M13-GTCAGCCTCCACCACATCACTT R: CCTACCAGAGAACCCAAAACAGAA	56	(CA) ₂₉	229~239
PeIG33	F: M13-CAAGGAAGCGTATAGCCGGAGTCT R: TTCGAGGCGTTGCTGATTGTAAGT	68	(GT) ₂₁	120~180
PeIG37	F: M13-AGATTCAACGCTGTGTTCCCTGATC R: TAAATAAGTGGCGTGTAAAGACGAG	66	(CA) ₄ CG(CA) ₁₅ CG(CA) ₂₃	80~180
PeIG03	F: M13-AAGCTTACAATAAATATAGATAGAC R: CTCTCCACCAGTCATTTCTT	52	(TCTA) ₂₀	216~420
PCSH07	F: M13-TGTACTGTTCCACTTGTTGGTTG R: ATTTGACAGCATAAATCATTGGC	55	(AG) ₁₁	120~200
PeIG29	F: M13-TTTTTGGGCTATGTGACGAG R: GAAAGTCATGGGTGTAGGTGTAAC	56	(TATC) ₉	95~165

1.3 PCR 扩增与数据分析

PCR 反应分 2 步进行。第 1 步把 SSR 反向引物与 M13 的正向引物相连扩增为 M13-SSR 引物, 第 2 步 SSR 扩增产物的荧光标记, 使用 M1-SSR3 引物与 SSR 正向引物扩增获得的 PCR 产物与表 1 中 M13 荧光引物再进行扩增, 所采用的 PCR 反应体系均经过了优化。在筛选引物时, 先用 PAGE 检测引物的扩增效果, 然后选取扩增效果理想的扩增产物交由生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行分型 (图 2)。

采用软件 POPGEN 3.2 统计群体的遗传多样性参数; 根据 Botstein 公式^[20] 计算 Hardy-Weinberg 遗传偏离指数 (D)^[21], 采用 Bonferroni 方法校正显著性标准; 群体遗传分化指数 (F_{st}) 及基因流 (N_m) 利用软件 CERVUS 3.0 统计并进行分子方差分析 (AMOVA); Structure 2.3^[22-23] 等软件对群体的遗传结构进行统计和分析; 基于遗传距离用 Mega 4.0 软件构建 UPGMA 系统进化树。

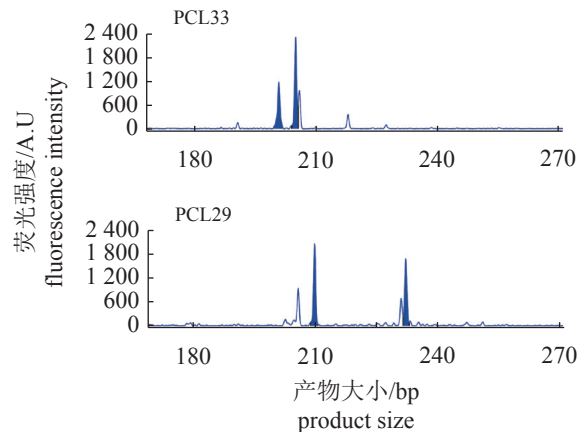


图 2 荧光修饰引物微卫星位点等位基因分型
Fig. 2 Chromatomap for alleles genotypes of fluorescence modifier microsatellite site

2 结果

2.1 种群遗传多样性分析

10 对微卫星引物扩增结果显示, 等位基因数

(N_a) 为 3~33 个 (平均 15.70 个), 有效等位基因数 (N_e) 为 1.50~13.89 (平均 4.76 个), 观测杂合度 (H_o) 为 0.12~0.91, 期望杂合度 (H_e) 为 0.33~0.93; 各群体的多态性信息含量 (PIC) 为 0.31~0.92, 除

了 PCL28 位点为中度多态性外, 其他 9 个位点均属于高度多态性位点 ($PIC>0.5$) (表 3), 可用于微卫星遗传结构分析。

表 3 克氏原螯虾 15 个微卫星位点的遗传多样性参数

Tab. 3 Statistics of number of effective alleles, expected and observed heterozygosity and polymorphism information content for microsatellite loci of *P. clarkii*

位点 locus	样本量/尾 sample size	等位基因数 N_a	有效等位基因数 N_e	观测杂合度 H_o	期望杂合度 H_e	多态性信息含量 PIC
PclG02	270	8.00	3.97	0.52	0.75	0.71
PCL33	270	15.00	3.58	0.66	0.72	0.70
PCL29	270	33.00	13.89	0.91	0.93	0.92
PCL02	270	20.00	4.37	0.16	0.77	0.75
PCL28	270	3.00	1.50	0.12	0.33	0.31
PclG33	270	13.00	2.47	0.24	0.60	0.57
PclG37	270	20.00	3.27	0.43	0.70	0.68
PclG03	270	14.00	4.88	0.24	0.80	0.77
PCSH07	270	14.00	3.62	0.63	0.73	0.68
PclG29	270	17.00	6.03	0.40	0.84	0.82
平均值 mean	270	15.70	4.76	0.43	0.72	0.69

9 个克氏原螯虾群体 (270 尾) 的遗传多样性如表 4 所示, 总体上, 9 个群体均具有较高的遗传多样性。群体水平遗传多样性参数比较发现, XC 群体在等位基因数 ($N_a=7.70$)、有效等位基因数 ($N_e=4.40$)、观测杂合度 ($H_o=0.50$)、期望杂合度 ($H_e=0.74$) 和多态性信息含量 ($PIC=0.67$) 均最高, 与其他群体间均存在显著差异 ($P>0.05$), 而 JL 群体的遗传多样性最低 ($PIC=0.48$), 其群体的遗传多样性有待提高。总体上 9 个群体均具有较高的遗传多样性, 且安徽地区人工养殖群体的遗传多样性普遍高于其他几个群体。

表 4 克氏原螯虾 9 个群体的遗传多样性参数

Tab. 4 Summary statistics of genetic diversity of nine *P. clarkii* populations

	JL	JH	GH	XH	TL	MAS	WH	XC	HF
N_a	5.10	6.30	5.50	6.20	6.60	5.70	6.30	7.70	6.90
N_e	2.70	3.21	2.85	3.55	3.32	3.16	3.20	4.40	4.03
H_o	0.43	0.41	0.42	0.33	0.47	0.44	0.45	0.50	0.43
H_e	0.54	0.64	0.58	0.67	0.60	0.60	0.60	0.74	0.65
PIC	0.48	0.59	0.53	0.62	0.56	0.55	0.56	0.67	0.60

利用 Hardy-Weinberg 平衡对 9 个群体中所有位点基因平衡状态进行检验, 9 个群体各位点平均遗传偏离指数为 -0.568~-0.178, 经邦弗朗尼校正, 9 个群体的大多数位点均显著偏离 Hardy-

Weinberg 平衡 (表 5), 与其他群体相比, HF 群体的偏离程度最高, JL 和 XH 群体的偏离程度最低。此外, 人工养殖群体和野生群体均表现出杂合子缺失现象, 由于其具有较强的繁殖力, 亲缘关系较近的后代极易发生近亲繁殖, 说明近亲繁殖是群体间偏离 Hardy-Weinberg 平衡的主要因素, 为安徽地区克氏原螯虾人工养殖群体的遗传改良提供参考。

2.2 种群遗传分化分析

克氏原螯虾 9 个群体基因流 (N_m) 及群体遗传分化指数 (F_{st}) 显示, 各群体间基因流为 1.028~10.299, 不同群体之间存在着广泛的基因交换, GH 和 JH 群体间的基因交流最广泛 ($N_m=10.299$)。群体遗传分化指数为 0.024~0.196, 其中除了 XC 群体的分化程度较低 ($F_{st}<0.05$), HF 群体与其他群体的 F_{st} 均表现出高度分化 ($F_{st}>0.15$) (表 6)。

9 个克氏原螯虾群体遗传相似系数和遗传距离结果显示, 各群体间遗传相似系数 (I) 为 0.078~0.939, 遗传距离 (D_A) 为 0.064~0.746; WH 群体与 JH 群体的遗传距离最小, 遗传相似度最大。而 JH 群体与 XH 群体的遗传距离最大, 遗传相似度最小 (表 7)。AMOVA 分析结果表明, 88.58% 的遗传变异来自群体内变异, 而其余的 (11.42%) 来自群体间的变异, 群体间遗传分化达到极显著水平 ($P<0.01$) (表 8)。

表 5 克氏原螯虾 9 个群体遗传偏离指数 (D)

Tab. 5 Deviation (D) assessed for the nine populations of *P. clarkii*

位点 locus	遗传偏离指数 D								
	JL	JH	GH	XH	TL	MAS	WH	XC	HF
pclG02	0.077**	-0.365**	-0.115	-0.486	-0.094	0.255*	0.182	-0.474*	-0.123
pcl33	0.452	0.206	-0.009	-1.000	0.142	0.292	0.002	0.075	-0.614*
pcl29	-0.077	-0.115	0.026*	-0.030	0.118	0.038	0.118	0.117	0.106*
pcl02	-0.724	-0.910	-0.666	-0.812	-0.875**	-0.748*	-0.833*	-0.692	-0.732
pcl28	0.035	-0.523**	-0.357	-1.000	0.092	-0.205	-0.272	-0.786*	-0.627**
pclG33	-0.485	0.069	-0.230*	-1.000**	-0.125**	0.027*	-0.113*	-0.621	-0.764*
pclG37	-0.209	-0.395**	-0.369*	-0.371	-0.190	-0.183	-0.344*	-0.434	-0.446**
pclG03	-0.389	-0.740	-0.696	-0.687	-0.583*	-0.899	-0.738*	-0.360*	-0.686*
PCSH07	-0.161	-0.429*	-0.181	0.046	0.185	0.040*	-0.029*	-0.041	-0.137
pclG29	-0.301	-0.452*	-0.551	-0.344	-0.731	-0.746*	-0.438	-0.241	0.025
平均值 mean	-0.178	-0.366	-0.315	-0.568	-0.206	-0.213	-0.247	-0.346	-0.400

注: *表示统计学显著水平($P<0.05$); **表示统计学极显著水平($P<0.01$), 下同。
Notes: * indicates statistically significant level ($P<0.05$); ** indicates statistically highly significant level ($P<0.01$), the same below.

表 6 克氏原螯虾 9 个群体基因流 (N_m , 对角线上) 和遗传分化系数 (F_{st} , 对角线下)

Tab. 6 Gene flow (N_m , above diagonal) and genetic diversity (F_{st} , below diagonal) in nine *P. clarkii* populations

	JL	JH	GH	XH	TL	MAS	WH	XC	HF
JL		4.623	3.889	1.436	2.467	2.184	3.001	1.187	1.038
JH	0.051		10.299	2.543	2.919	5.674	9.710	1.660	1.360
GH	0.060	0.024		2.218	2.480	2.556	4.720	1.626	1.320
XH	0.148	0.090	0.101		1.753	2.037	2.268	1.542	1.282
TL	0.092	0.079	0.092	0.125		1.783	2.604	1.386	1.028
MAS	0.103	0.042	0.089	0.109	0.123		6.210	1.252	1.111
WH	0.077	0.025	0.050	0.099	0.088	0.039		1.540	1.354
XC	0.174	0.131	0.133	0.140	0.153	0.166	0.140		5.674
HF	0.194	0.155	0.159	0.163	0.196	0.184	0.156	0.042	

表 7 克氏原螯虾 9 个群体间遗传相似系数 (I , 对角线上) 及遗传距离 (D_A , 对角线下)

Tab. 7 Genetic similarity indices (I , above the diagonal) and genetic distances (D_A , below the diagonal) among nine populations of *P. clarkii*

	JL	JH	GH	XH	TL	MAS	WH	XC	HF
JL		0.902	0.896	0.691	0.821	0.834	0.868	0.507	0.546
JH	0.103		0.934	0.733	0.786	0.915	0.939	0.474	0.527
GH	0.109	0.068		0.724	0.787	0.848	0.848	0.511	0.542
XH	0.370	0.311	0.324		0.655	0.723	0.723	0.553	0.555
TL	0.197	0.241	0.240	0.423		0.743	0.743	0.570	0.553
MAS	0.181	0.089	0.165	0.324	0.298		0.876	0.475	0.552
WH	0.142	0.064	0.091	0.330	0.239	0.078		0.494	0.564
XC	0.680	0.746	0.672	0.593	0.563	0.745	0.706		0.883
HF	0.606	0.640	0.612	0.589	0.592	0.594	0.573	0.124	

表 8 安徽省克氏原螯虾群体分子方差分析

Tab. 8 AMOVA analysis among *P. clarkii* populations in Anhui Province

变异来源 source of variation	自由度 df	平方和 sum of squares	变异组分 variance components	变异百分比/% percentage of variation	遗传固定系数 F_{st}	显著性 P-value
种群间 among populations	8	213.720	0.394	11.42		
种群内 within populations	531	1 624.517	3.059	88.58		
总计 total	539	1 838.237	3.454		0.114	0.000**

基于 Nei 氏遗传距离对克氏原螯虾 9 个群体构建 UPGMA 系统树, 结果显示, 9 个群体可分为 5 组, 即 WH、GH、MAS 和 JH 群体聚为一组, XC 和 HF 群体同属于一组, 而 TL、XH 及 JL 群体分别自成一组 (图 3)。

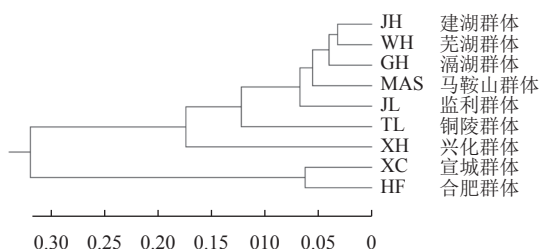


图 3 基于 Nei 氏遗传距离的 UPGMA 聚类树

Fig. 3 UPGMA clustering tree based on Nei's genetic distance

2.3 种群遗传结构分析

本研究根据 K 值对应参数的趋势分析, 发现 $K=5$ 时出现折点 (图 4, 图 5), 说明最有可能的亚种群数为 5。图 5 给出了 $K=3$ 、 $K=4$ 和 $K=5$ 的遗传结构图。在养殖群体中 XC 和 HF 2 个养殖群体的大多数个体被分配到相同的遗传群的中, 这表明它们具有较高的遗传相似性; 而其他养殖群体

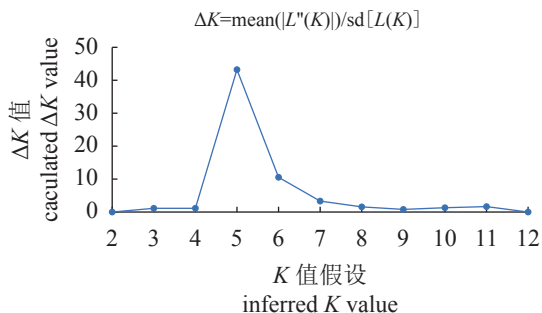


图 4 用 Structure 获得的平均可能性和 ΔK 评估 (利用 Structure 软件 12 次重复计算 ΔK 的平均值)

Fig. 4 Plot of mean likelihood values (averaged across 12 runs) and estimate of ΔK for each possible value of K using the data obtained from Structure software

的一些个体较混杂。在野生群体中, TL 群体的个体遗传结构相对单一, 与其他群体的个体有明显区别。

3 讨论

SSR 标记因具有多态性高、易操作及共显性遗传等特点, 已被广泛应用于水产动物种质资源和选择育种等研究中^[5-6]。本研究采用的 10 对微卫星位点的平均等位基因数 (N_a) 15.70 个, 平均有效等位基因数 (N_e) 4.76 个, 与 Yue 等^[12]、Zhong 等^[23]和邢智璐等^[14]的结果相比均较高, 具有高度多态性, 但仍低于曹玲亮等^[24]获得的平均等位基因数, 这与检测技术和样本收集的差异密切相关, 即便使用相同的微卫星位点, 但在采用不同检测技术进行分析时仍有可能表现出较大差异, 通常认为先进的检测技术是等位基因检测的分辨率和准确性的有效保障^[25]。多态性信息含量 (PIC) 为 0.31~0.92, 根据相关标准^[26], 高度多态性位点的 PIC 大于 0.50, 而小于 0.25 的为低度多态性位点, 本研究中除了 PCL28 位点为中度多态性外, 其他均属于高度多态性位点, 均能用于各群体的遗传多样性分析。

克氏原螯虾作为一种入侵物种, 由于其具有较高的商业价值, 已成为中国最重要的淡水水产资源之一^[26]。研究者们通过采集我国不同地区种质的克氏原螯虾群体来研究我国克氏原螯虾的入侵路线, 发现我国的克氏原螯虾已具有较高的遗传多样性^[12-14, 24]。为了满足消费者的需求, 我国各地区开展了大量的克氏原螯虾的人工饲养, 由于不同的生长条件和管理差异, 从而导致了不同种群之间不同的质量水平和遗传多样性。本研究中, 9 个群体均具有较高的遗传多样性, 其中, XC 群体的遗传多样性显著高于大多数群体 ($P>0.05$), 可能与其受开发利用程度较低有关。而 JL 群体的遗传多样性均显著低于大多数群体, 应与多代人工选择造成较高种质纯度有关, 2 个人工养殖群

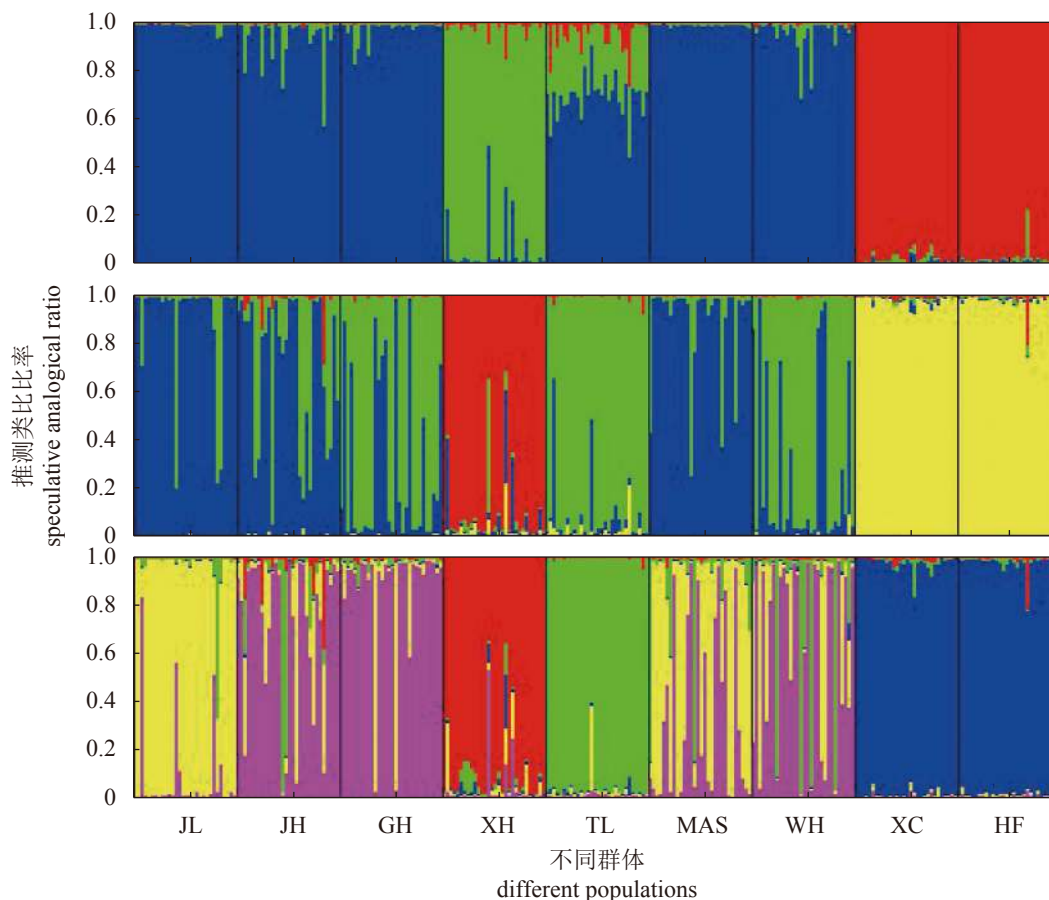


图5 克氏原螯虾9个群体所有个体的遗传结构图

Fig. 5 Output from the program Structure assuming ($K=3$), ($K=4$) and ($K=5$) nine populations of *P. clarkii*

体所表现出的遗传多样性水平差异, 可能与其育种技术及育种的基础群体相关。总体上, 安徽人工养殖群体的遗传多样性均高于对照群体, 与 Zhong 等^[23] 和李艳和^[13] 报道的群体相比均保持了相对较高的遗传多样性。这可能是由于从各种种群中多次引入不同的个体和不同的养殖条件, 产生了迅速的遗传变异, 使得种群具有较高的遗传多样性。Hardy-Weinberg 平衡表明, 9 个群体均存在显著的杂合子缺失, 其中 HF 群体表现更突出, 类似于 Yue 等^[12] 的发现, 这可能是由于创始人效应和非随机交配引起^[27-28], 安徽作为我国克氏原螯虾主要产区之一, 其养殖群体应该存在大量的引种现象。由于克氏原螯虾的繁殖能力较强, 在人工养殖过程中极易造成亲缘相近的克氏原螯虾个体间发生交配, 因此, 有必要加强不同区域间的群体进行交配, 以改善近亲繁殖的现状。

遗传结构是判断新物种适应新栖息地能力的主要因素^[29]。根据 AMOVA 结果显示, 变异主要发生在种群内 (88.58%), 只有很小一部分发生在

种群间, 与邢智珺等^[14] 和 Yi 等^[30] 的研究结果一致, 人工养殖种群与野生种群的 AMOVA 结果相同。大多数学者认为, 不同群体具有不同的遗传分化^[30-31], 物种间的遗传分化与基因交流密切相关^[32]。本研究中, 在安徽地区的人工养殖群体中, WH 与 JH 群体间基因流水平最高 ($N_m=9.710$), 遗传分化指数最小 ($F_{st}=0.025$), 说明 2 群体间的基因交流较为广泛 ($N_m>4$), 2 个群体间存在相互引种的可能。HF 与 TL 群体间基因流水平最低 ($N_m=1.028$), 遗传分化指数最高 ($F_{st}=0.196$), 说明 2 群体间基因交流较为匮乏, 群体间存在显著遗传分化 ($F_{st}>0.15$), 这可能是由于长期封闭养殖模式和人工引入造成的, 因为本研究 WH 和 HF 群体是人工养殖群体, 野生群体不能进入与之交配, 造成类似自然地理隔离, 降低了发生基因交流的可能性。因此, 可以通过改善育种技术和降低捕捞强度来加强群体间的基因交流。

由于人类传播、遗传漂变和种群规模等多种因素的影响^[12], 使得遗传距离与地理距离相关性

显著降低。本研究中的 JL 群体在地理上均远离其他 8 个群体, 但克氏原螯虾具有较高的商业价值, 因此他们之间的遗传距离不同可能是引种程度不同所造成的。9 个克氏原螯虾群体基于 Nei 氏遗传距离构建的 UPGMA 系统树显示, 9 个群体可分为 5 组, 即 JH、WU、GH 和 MAS 群体聚为一组, XC 和 HF 群体同属于一组, 而 TL、XH 和 JL 群体分别自成一组, 与 Structure 基于个体遗传组成的群体模拟分析的研究结果相类似。结合对群体遗传聚类及遗传结构等分析可以发现, XC 和 HF 群体的大多数个体被分配到相同的遗传群体中, 这可能与它们引进了相同的基础选育群体有关。而 WH 与 MAS 群体、JH 群体、GH 群体及 XH 群体的一些个体相较混杂, 极有可能是它们之间相互引种所导致的。在野生群体中, TL 群体的个体遗传结构相对单一, 与其他群体的个体有着明显的区别, 说明 TL 群体的开发利用程度较低。相对自然选择, 位点等位基因频率与人工干预程度有着重要的影响, 而且位点等位基因频率改变和群体遗传结构纯化与人工选择过程的相关性更明显。

总之, 通过对这 9 个群体的遗传多样性和遗传机构分析, 可以看出安徽地区的人工养殖群体具有较高的遗传多样性, 其中 XC 群体的遗传多样性最高, 遗传结构也较为合理, 可以作为人工引种的基础选育群体。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] Huang S. New thoughts on an old riddle: what determines genetic diversity within and between species?[J]. *Genomics*, 2016, 108(1): 3-10.
- [2] Mason A S. SSR genotyping[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2015, 1245: 77-89.
- [3] Varshney R K, Graner A, Sorrells M E. Genic microsatellite markers in plants: features and applications[J]. *Trends in Biotechnology*, 2005, 23(1): 48-55.
- [4] Presti F T, Wasko A P. A review of microsatellite markers and their application on genetic diversity studies in parrots[J]. *Open Journal of Genetics*, 2014, 4(2): 69-77.
- [5] Chistiakov D A, Hellemans B, Volckaert F A M. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: a review with special reference to fish genetics[J]. *Aquaculture*, 2006, 255(1-4): 1-29.
- [6] Tong J G, Sun X W. Genetic and genomic analyses for economically important traits and their applications in molecular breeding of cultured fish[J]. *Science China Life Sciences*, 2015, 58(2): 178-186.
- [7] Huner J V. *Procambarus* in North America and elsewhere[M]//Holdich D M, Lowery R S. *Freshwater crayfish: biology, management and exploitation*. London: Croom Helm Ltd., 1988: 239-261.
- [8] 王亚民, 曹文宣. 中国水生外来入侵物种对策研究[J]. *农业环境科学学报*, 2006, 25(1): 7-13.
- Wang Y M, Cao W X. The strategies of aquatic invasive alien species (IAS) in China[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2006, 25(1): 7-13 (in Chinese).
- [9] Barbaresi S, Fani R, Gherardi F, et al. Genetic variability in European populations of an invasive American crayfish: preliminary results[J]. *Biological Invasions*, 2003, 5(3): 269-274.
- [10] Belfiore N M, May B. Variable microsatellite loci in red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*, and their characterization in other crayfish taxa[J]. *Molecular Ecology*, 2000, 9(12): 2230-2234.
- [11] Duncan S I, Robertson E P, Fletcher R J Jr, et al. Urbanization and population genetic structure of the panama city crayfish (*Procambarus econfinae*)[J]. *Journal of Heredity*, 2020, 111(2): 204-215.
- [12] Yue G H, Li J L, Bai Z Y, et al. Genetic diversity and population structure of the invasive alien red swamp crayfish[J]. *Biological Invasions*, 2010, 12(8): 2697-2706.
- [13] 李艳和. 克氏原螯虾在我国的入侵遗传学研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2013.
- Li Y H. *Invasion genetics of Procambarus clarkii in China*[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2013 (in Chinese).
- [14] 邢智珺, 姜虎成, 陆伟, 等. 江苏 8 个克氏原螯虾群体遗传多样性微卫星分析[J]. *上海海洋大学学报*, 2014, 23(5): 656-662.
- Xing Z J, Jiang H C, Lu W, et al. Genetic diversity analysis of eight *Procambarus clarkii* stocks in Jiangsu Province based on microsatellites[J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2014, 23(5): 656-662 (in Chinese).
- [15] 中国稻渔综合种养产业发展报告 (2020)[J]. *中国水产*, 中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries

- 2020(10): 12-19.
Report on the development of rice-fish integrated farming industry in China (2020)[J]. *China Fisheries*, 2020(10): 12-19 (in Chinese).
- [16] 2020 中国小龙虾产业发展报告 [J]. *中国水产*, 2020 (7): 8-17.
Report on the development of China crawfish industry in 2020 [J]. *China Fisheries*, 2020(7): 8-17 (in Chinese).
- [17] 董扬帆, 李军涛, 张秀霞, 等. 克氏原螯虾繁殖生物学与苗种培育技术研究进展[J]. *水产学杂志*, 2020, 33(4): 68-74.
Dong Y F, Li J T, Zhang X X, *et al.* A review: research advances on seedling breeding of red swamp crayfish *Procambarus clarkii*[J]. *Chinese Journal of Fisheries*, 2020, 33(4): 68-74 (in Chinese).
- [18] Schuelke M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments[J]. *Nature Biotechnology*, 2000, 18(2): 233-234.
- [19] Zhu Z Y, Yue G H. Eleven polymorphic microsatellites isolated from red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*[J]. *Molecular Ecology Resources*, 2008, 8(4): 796-798.
- [20] Botstein D, White R L, Skolnick M, *et al.* Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms[J]. *American Journal of Human Genetics*, 1980, 32(3): 314-331.
- [21] 耿波, 孙效文, 梁利群, 等. 利用17个微卫星标记分析鳊鱼的遗传多样性[J]. *遗传*, 2006, 28(6): 683-688.
Geng B, Sun X W, Liang L Q, *et al.* Microsatellite analysis of genetic diversity of *Aristichthys nobilis* in China[J]. *Hereditas*, 2006, 28(6): 683-688 (in Chinese).
- [22] Pritchard J K, Stephens M, Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data[J]. *Genetics*, 2000, 155(2): 945-959.
- [23] Zhong Y Z, Tang Z S, Huang L M, *et al.* Genetic diversity of *Procambarus clarkii* populations based on mitochondrial DNA and microsatellite markers in different areas of Guangxi, China[J]. *Mitochondrial DNA Part A*, 2020, 31(2): 48-56.
- [24] 曹玲亮, 周立志, 张保卫. 安徽三大水系入侵物种克氏原螯虾的种群遗传格局[J]. *生物多样性*, 2010, 18(4): 398-407.
Cao L L, Zhou L Z, Zhang B W. Genetic patterns of an invasive *Procambarus clarkii* population in the three river basins of Anhui Province[J]. *Biodiversity Science*, 2010, 18(4): 398-407 (in Chinese).
- [25] 董在杰, 刘念, 傅建军, 等. 6个野生与选育鲤群体的微卫星遗传分析[J]. *南方水产科学*, 2018, 14(4): 46-55.
Dong Z J, Liu N, Fu J J, *et al.* Genetic analysis for six wild and selection populations of common carp (*Cyprinus carpio*) using microsatellites[J]. *South China Fisheries Science*, 2018, 14(4): 46-55 (in Chinese).
- [26] Bi K R, Gu W, Wang W. Sensitive and rapid detection of freshwater crustacean *Spiroplasmas* by ISRs-sequence-targeted species-specific primers[J]. *European Food Research and Technology*, 2008, 227(6): 1733-1737.
- [27] Song J, Song Z B, Yue B S, *et al.* Assessing genetic diversity of wild populations of *Prenant's* schizothoracin, *Schizothorax prenanti*, using AFLP markers[J]. *Environmental Biology of Fishes*, 2006, 77(1): 79-86.
- [28] Zhu B F, Huang Y, Dai Y G, *et al.* Genetic diversity among red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*) populations in the middle and lower reaches of the Yangtze River based on AFLP markers[J]. *Genetics and Molecular Research*, 2013, 12(1): 791-800.
- [29] Bazin E, Glémin S, Galtier N. Population size does not influence mitochondrial genetic diversity in animals[J]. *Science*, 2006, 312(5773): 570-572.
- [30] Yi S K, Li Y H, Shi L L, *et al.* Characterization of population genetic structure of red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*, in China[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 5586.
- [31] Huang J L, Tang S Q, Cai F J, *et al.* Microsatellite evidence of dispersal mechanism of red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*) in the Pearl River basin and implications for its management[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 8272.
- [32] Nei M. *Molecular evolutionary genetics*[M]. New York: Columbia University Press, 1987: 159-164.

Genetic diversity and structure analysis of *Procambarus clarkii* populations in Anhui Province

CUI Wentao¹, ZOU Yufan¹, BAI Zhiyi^{1,2*}, WANG Zhiyan¹, LI Dianzhong³

(1. Key Laboratory of Genetic Resources for Freshwater Aquaculture and Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Shanghai Engineering Research Center of Aquaculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

3. Wuhu Shengdian Leisure Ecological Park Co., Ltd., Wuhu 241200, China)

Abstract: Anhui is one of the main areas of artificial crawfish (*Procambarus clarkia*) farming in China. To understand the genetic diversity of cultured *P. clarkii* populations in Anhui Province, this study selected three artificial cultured populations of *P. clarkii* in Anhui (WH, XC and HF) as the research object, with two wild population of *P. clarkii* in Anhui (TL and MAS) and four artificial cultured populations (JL, JH, GH and XH) as control. Ten pairs of *P. clarkii* microsatellite primers were selected to study microsatellite genetic diversity and genetic structure. The results revealed that the genetic diversity of *P. clarkii* artificial cultured in Anhui was higher than wild population and four artificial cultured populations (JL, JH, GH and XH), and the XC population had the highest genetic diversity. Tests of deviation from Hardy-Weinberg equilibrium indicated all 10 loci in 9 populations were significantly deviated from Hardy-Weinberg equilibrium after Bonferroni correction and most of them had significant heterozygosity deficiency. AMOVA analysis showed that genetic variation was determined within the population. F_{st} in most groups showed moderate differentiation ($0.05 < F_{st} < 0.15$). The gene flow demonstrated there were extensive gene exchanges between different populations, particularly between GH and JH. UPGMA tree revealed that XC and HF belonged to the same clade, and WU、GH、MAS and JH were in the other clade, whereas the remaining populations formed their own clade. STRUCTUR results showed that most individuals in XC and HF populations were assigned to the same genetic population, suggesting that they may have the same origin. The results showed that the cultured population of *P. clarkii* in Anhui had high genetic diversity, which provided reference for the protection and improvement of *P. clarkii* germplasm resources in Anhui.

Key words: *Procambarus clarkii*; genetic diversity; genetic structure; microsatellites

Corresponding author: BAI Zhiyi. E-mail: zybai@shou.edu.cn

Funding projects: Anhui Agricultural Production Development Project Funds; the Seventh Batch of Jiujiang City “Double Hundred and Double Thousand” Talent Project (JJSZF-201912-2959571)