

淮河克氏原螯虾种群遗传结构

李小花 刘刚[#] 周立志* 鲁的苗

安徽大学资源与环境工程学院 合肥 230601

摘要: 克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)是广泛分布于我国淡水水域的外来入侵物种,对其种群遗传结构的研究有助于了解种群扩散过程。本文测定了淮河流域自然水体中9个地理种群共151个野生克氏原螯虾线粒体COI序列,获得624 bp的有效基因片段,共定义了25个单倍型。AMOVA分析结果表明,淮河流域的克氏原螯虾种群内的变异占主导地位,单倍型多样性和核苷酸多样性均为中等水平,各地理种群间平均遗传差异较小($F_{st}=0.078$),遗传差异不显著。系统发生树并没有按地理位置形成对应族群,表明克氏原螯虾各地理种群间存在明显的基因流,各地理种群间没有形成明显的种群遗传分化。

关键词: 克氏原螯虾;线粒体细胞色素氧化酶I;种群遗传结构;淮河

中图分类号:Q953 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2013)06-868-07

Population Genetic Structure of Red Swamp Crayfish in Haihe River Wetlands

LI Xiao-Hua LIU Gang[#] ZHOU Li-Zhi* LU Di-Miao

School of Resources and Environmental Engineering, Anhui University, Hefei 230061, China

Abstract: *Procambarus clarkii* is an alien invasive crayfish species which is widely distributed in wetlands in China. Clarification of *P. clarkii* population genetic structure will help to understand its spread process. Here, we analyzed the population genetic structures of 9 populations of 151 crayfish individuals in Huaihe river based on the CO I region. The results showed that the 624 bp long CO I region aligned across 25 haplotypes. AMOVA showed that intra-population variation (92.20%) was much higher than inter-population variation (7.80%). Haplotype diversity and nucleotide diversity were moderate, and the differentiation among populations was non-significant ($F_{st}=0.078$). Phylogenetic tree shows that the genealogical clusters do not match the sample locations well, suggesting that genetic differentiation among them is not remarkable, while the gene flow is evident.

Key words: *Procambarus clarkii*; Cytochrome oxidase subunit I; Population genetic structure; Huaihe River

物种的遗传多样性和遗传结构与其适应能力、生存能力和进化潜力密切相关,生境异质性是物种遗传分化的重要环境选择压力(Hedgecock et al. 1979, Barbaresi et al. 2003, 郑芳等 2006, 姜叶琴 2009, Yue et al. 2010)。因此,种群的遗传多样性和遗传结构一定程度上能反映出不同生态环境下物种种群结构的变化(祁得林等 2008, 项贤领等 2010)。基因流、有效种群大小和遗传组

成等是研究种群遗传多样性及遗传结构的

基金项目 安徽省自然科学基金项目(No. 11040606M76),安徽大学大学生科研训练计划项目(No. KYXL20110041);

* 通讯作者, E-mail: zhoulz@ahu.edu.cn;

第一作者介绍 李小花,女,本科生;研究方向:种群遗传学; E-mail: lixiaohuaat@163.com。

#共同第一作者,刘刚,男,博士研究生;研究方向:种群遗传学; E-mail: liugang8966@163.com。

收稿日期:2013-01-27,修回日期:2013-05-21

重要内容,这些研究对我们更好地了解物种的形成、适应、分化和扩散规律等具有重要意义 (Barbaresi et al. 2003, Palstra et al. 2007)。

随着现代生物技术的不断发展,研究遗传多样性的方法也在逐步发展,目前,已经从传统的形态标记、染色体标记以及生化标记发展到分子标记。随着分子生物技术的兴起与发展,使得以分子生物学技术为手段、在分子水平上研究物种内不同地理种群遗传结构成为可能。近年来,随着 PCR 扩增技术和 DNA 测序技术等现代分子生物学技术的日趋成熟,通过 DNA 序列信息了解物种不同地理种群的遗传分化越来越受到人们的重视,一些分子标记开始应用于水生生物种群遗传学分析的研究中。线粒体 DNA 以其进化速率快、遵循母系遗传等特点,已经成为种群遗传学研究的有效标记之一。*CO I* 基因是线粒体基因组中 13 个蛋白质编码基因之一,该基因序列变异性较大、替换速率快及易于扩增,在种间和种内都表现较大的变异性,可提供丰富的多态信息,适合于种及种下水平的系统分析,目前已被广泛地应用于物种的分子系统学和种群遗传学研究中 (Boore 1999, Medina et al. 2000, Donald et al. 2005)。

克氏原螯虾 (*Procambarus clarkii*) 原产于北美洲和墨西哥,自 1929 年经日本引入中国南京以来,已成为我国重要的水产资源 (王长忠等 2009)。由于其杂食性、生长速度快、适应能力强,其自然种群发展迅速,在当地生态环境中形成绝对的竞争优势并逐渐归化于中国自然水体,现已广泛分布于我国东部和中部地区十余个省市,甚至在有些地区已成为优势种 (王长忠等 2009)。克氏原螯虾由于较成功地入侵到全球的一些国家,因此常作为入侵物种遗传多样性的模式物种来进行广泛的研究。迄今为止,国内外已经在同工酶、线粒体 DNA、微卫星水平上对克氏原螯虾遗传结构及遗传多样性进

行了研究 (Barbaresi et al. 2003, 王长忠等 2009)。

淮河作为我国东部地区一条重要的河流,淮河干流及与之连通的浅水湖泊构成重要的河湖复合生态系统,是我国克氏原螯虾的重要分布地区。本研究拟通过线粒体 *CO I* 基因分析淮河克氏原螯虾野生种群的遗传多样性,探讨其自然种群的遗传分化程度和不同地理种群间的基因交流情况,以期野生克氏原螯虾种群的遗传多样性研究和资源开发利用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 样本采集 于 2011 年 4~11 月在淮河流域自然水体中共采集 151 个野生克氏原螯虾个体。采样点分别是河南省信阳市甘岸 (ga)、淮滨县 (hb),安徽省阜阳市王家坝镇 (fy)、颍上县 (ys)、瓦埠湖 (wbh)、蚌埠市 (bb)、临淮关 (lh)、女山湖 (nsh) 和江苏省盱眙县 (xy) 9 个地理种群 (图 1, 表 1)。每个地理种群采样数目在 10~22 个,共 151 个样本,采集后用无水乙醇浸泡保存备用。

1.2 DNA 提取与 PCR 扩增 模板 DNA 采用常规苯酚/氯仿法抽提,经 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测合格后 -20°C 保存。*CO I* 基因片段的引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成,引物序列为, *CO I* F: 5'-ATT GTC ACT GCC CAC GCA TT-3', *CO I* R: 5'-TGT TGG TAG AGG ATC GGG TC-3'。PCR 反应体系: $10 \times$ PCR buffer 2.5 μl , dNTPs 2 μl (0.2 mmol/L), 模板 DNA 1 μl (10~100 ng), 上下游引物各 1 μl (0.2 mmol/L), 1 U 的 *Taq* 酶 (Trans *Taq-T* DNA Polymerase), 灭菌 ddH₂O 补足至 25 μl 。PCR 反应条件为: 94°C 预变性 5 min; 94°C 变性 30 s, 50°C 退火 40 s, 72°C 延伸 1 min, 35 个循环; 72°C 终延伸 5 min。PCR 产物用胶回收试剂盒纯化后,直接作为测序模板,委托生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行双向测序。

表 1 采样点以及样本信息

Table 1 Information of samples and their localities

地理种群 Local population	种群代码 Population code	采集地点 Sampling site	地理坐标 Geo-coord inates	分析个体数(尾) Number of individuals assayed
甘岸 Gan'an	ga	信阳市甘岸淮河大桥	32°16'35"N/114°01'47"E	10
淮滨 Huaibin	hb	淮滨县淮河大桥	32°26'02"N/115°22'55"E	14
阜阳 Fuyang	fy	阜阳市王家坝镇	32°25'38"N/115°36'11"E	21
颍上 Yingshang	ys	颍上县鲁口镇	32°32'39"N/116°33'32"E	19
瓦埠湖 Wabu Lake	wbh	寿县瓦埠湖	32°22'14"N/116°53'11"E	22
蚌埠 Bengbu	bb	蚌埠市蚌埠闸	32°57'13"N/117°17'16"E	13
临淮关 Linhuaiguan	lh	凤阳县临淮关	32°54'40"N/117°38'34"E	22
女山湖 Nvshan Lake	nsh	明光市女山湖	33°02'08"N/118°06'52"E	16
盱眙 Xuyi	xy	淮河入洪泽湖口	33°01'06"N/118°29'13"E	14

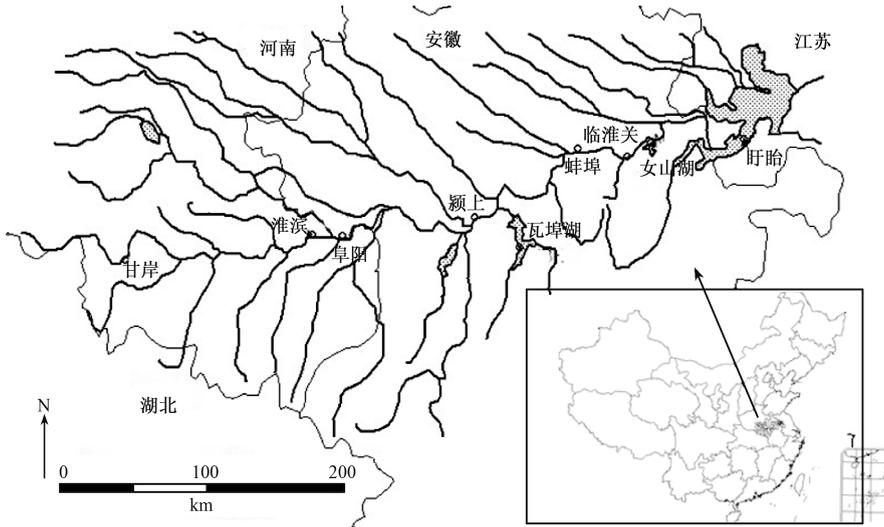


图 1 克氏原螯虾样本采集点

Fig. 1 Sampling sites of *Procamburus clarkii* in this study

◇ 采样点 Sampling sites

1.3 数据分析和处理 测序结果以 Chromas 2.13 软件进行核对确认,采用 Clustal_X 1.8 进行序列比对,利用 MEGA 4.0 软件分析序列的碱基组成,应用 Kimura 双参数法计算遗传距离,利用 DnaSP (version 4.0) 软件统计单倍型、计算单倍型多样性 (h) 及核苷酸多样性 (π),单倍型序列已上传至 GenBank (序列号: KC499580 ~ KC499604)。用 Arlequin 3.01 中的分子变异分析 (analysis of molecular variance, AMOVA) 估算种群间的分化系数 F_{st} (F-statistics) 和基因流 (N_m)。对所得 *CO I* 基因序列排序,根据不同基因型之间的遗传距离,以中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) *CO I* 基因序列 (序

列号为 HQ534048) 为外群,利用 Mega 4.0 软件基于 Kimura 两参数模型采用邻接法 (neighbor-joining, NJ) 构建 151 个克氏原螯虾系统发育树,采用 1 000 次自举检验来评估各自分支的置信度。

2 结果

2.1 mtDNA *CO I* 基因序列组成 对 *CO I* 基因进行分析比对后,共得到 151 个有效序列,选取中间长度为 624 bp 的序列进行比对分析。序列中共包括 254 个多态性位点,34 个简约信息位点和 24 个变异位点,没有碱基插入/缺失现象。A、T、G、C 含量分别为 26.7%、40.8%、

19.4%、13.1%,其中 A、T 含量(67.5%)明显高于 G、C 含量(32.5%),碱基组成存在明显的偏向性。

2.2 种群遗传变异和遗传结构 在 151 个克氏原螯虾 *CO I* 序列中,共定义了 25 个单倍型,其中 Hap_1 出现频率最高,在 9 个地理种群中都有分布;单倍型 Hap_2 由地理种群阜阳、颍上和瓦埠湖共享,占总数的 12%;单倍型 Hap_3 由地理种群淮滨、阜阳、颍上、瓦埠湖、临淮关、女山湖和盱眙共享,占 28%;单倍型 Hap_4 由地理种群甘岸和盱眙共享,占 8%;其余 21 个单倍型均为特有单倍型(表 2)。

对克氏原螯虾 9 个地理种群 *CO I* 基因序列的遗传差异 AMOVA 分析结果表明,在整个遗传变异中,种群间变异仅占 7.80%,种群内

的遗传变异占 92.20%(表 3)。单倍型多样性在 0~0.842 之间,其中颍上种群单倍型多样性最高($h=0.842$),而蚌埠种群单倍型多样性最低($h=0$)。核苷酸多样性最高的是盱眙种群($\pi=0.0523$),最低的为蚌埠种群($\pi=0$)(表 4)。

淮河流域克氏原螯虾种群间平均遗传分化程度处于中等水平,种群内部存在着明显的基因流($F_{st}=0.078, N_m=2.955$)。各地理种群间的遗传分化指数从 0.022 到 0.482 不等,种群间遗传分化指数最高的是蚌埠和瓦埠湖种群($F_{st}=0.482, N_m=0.268$),而同处于淮河干流的临淮关和女山湖种群的遗传分化指数最低,基因流水平最高($F_{st}=0.022, N_m=11.114$)(表 5)。

表 2 克氏原螯虾不同地理种群线粒体 *CO I* 基因单倍型频率

Table 2 The haplotype distribution of *CO I* gene in the local populations of *Procambarus clarkii*

单倍型 Haplotypes	地理种群 Local population								
	甘岸 Gan'an	淮滨 Huaibin	阜阳 Fuyang	颍上 Yingshang	蚌埠 Bengbu	瓦埠湖 Wabu Lake	临淮关 Linhuaiquan	女山湖 Nvshan Lake	盱眙 Xuyi
Hap_1	8	4	16	6	12	6	17	13	9
Hap_2			3	2		13			
Hap_3		2	2	5		1	1	3	2
Hap_4	2								1
Hap_5		1							
Hap_6		1							
Hap_7		1							
Hap_8		1							
Hap_9		1							
Hap_10		1							
Hap_11		1							
Hap_12		1							
Hap_13							1		
Hap_14							1		
Hap_15							1		
Hap_16							1		
Hap_17						1			
Hap_18						1			
Hap_19									1
Hap_20									1
Hap_21				1					
Hap_22				1					
Hap_23				1					
Hap_24				2					
Hap_25				1					

表3 克氏原螯虾线粒体 CO I 序列 AMOVA 分析
Table 3 Analysis of molecular variance (AMOVA) among the local populations of *Procambarus clarkii*

变异来源 Source of variation	自由度 Degree of freedom	平方和 Sum of squares	方差组分 Variance components	方差比例 Percentage of variation
种群间变异 Among populations	8	54.775	0.242	7.80
种群内变异 Within populations	141	402.365	2.854	92.20
总计 Total	149	457.140	3.095	100.00
固定指数 Fixation index	$F_{st} = 0.078, N_m = 2.955$			

表4 克氏原螯虾各地理种群的遗传参数
Table 4 Parameter summary of genetic diversity of *Procambarus clarkii*

地理种群 Local population	单倍型数 (N) Haplotype	单倍型多样性 (h) Haplotype diversity	核苷酸多样性 (π) Nucleotide diversity
甘岸 Gan'an	2	0.356	0.001 1
淮滨 Huaibin	10	0.835	0.013 8
阜阳 Fuyang	3	0.410	0.001 8
颍上 Yingshang	8	0.842	0.005 1
蚌埠 Bengbu	1	0	0.000 0
瓦埠湖 Wabu Lake	5	0.597	0.003 0
临淮关 Linhuaiquan	6	0.411	0.004 3
女山湖 Nvshan Lake	2	0.325	0.001 0
盱眙 Xuyi	5	0.593	0.052 3

表5 克氏原螯虾各地理种群间的遗传分化系数 (F_{st}) (下三角) 和遗传距离 (上三角)

Table 5 F_{st} values (below diagonal) and genetic distance (above diagonal) between the local populations of *Procambarus clarkii*

	蚌埠 Bengbu	阜阳 Fuyang	甘岸 Gan'an	淮滨 Huaibin	临淮关 Linhuaiquan	女山湖 Nvshan Lake	瓦埠湖 Wabu Lake	盱眙 Xuyi	颍上 Yinghang
蚌埠 Bengbu		5.847	1.575	2.108	10.117	2.177	0.268	2.086	1.943
阜阳 Fuyang	0.041		2.915	1.673	6.160	8.370	0.575	8.678	8.670
甘岸 Gan'an	0.137	0.079		2.657	9.001	1.766	0.320	10.620	2.044
淮滨 Huaibin	0.106	0.130	0.086		2.203	2.355	0.913	1.924	3.373
临淮关 Linhuaiquan	0.024	0.039	0.027	0.110		11.114	0.515	10.117	4.652
女山湖 Nvshan Lake	0.103	0.029	0.124	0.096	0.022		0.296	6.382	4.852
瓦埠湖 Wabu Lake	0.482	0.303	0.439	0.215	0.327	0.458		2.559	1.073
盱眙 Xuyi	0.107	0.028	0.023	0.115	0.024	0.038	0.089		1.869
颍上 Yingshang	0.114	0.028	0.109	0.069	0.051	0.049	0.189	0.118	

2.3 种群系统发育关系 基于得到克氏原螯虾 mtDNA CO I 的序列数据,根据不同基因型之间的遗传距离,构建淮河流域克氏原螯虾 151 个个体系统发生树(图 2)。结果显示,地理种群并没有按地理位置形成对应族群,但大部分个体能够按照相同采样点的个体聚为一枝,一些地方种群的个体则散布于不同的枝中。

3 讨论

线粒体基因组是严格母系遗传,其变异主要来源于基因突变,细胞色素氧化酶基因 CO I 进化速度相对较快,是检测种群遗传变异的有

效分子标记(Barbaresi et al. 2003,Palstra et al. 2007),在水生生物中已经广泛应用,该基因能为种群的鉴定提供有效信息;同时该基因片段易于扩增和测序,是研究无脊椎动物地理种群及近缘种问题的有效的工具(Dawson et al. 2001,Dawson 2003)。本研究中,克氏原螯虾 CO I 基因序列中的碱基 A、T 含量明显高于 C、G 含量,这与其他淡水虾类类似,且符合节肢动物 mtDNA 碱基组成中 G 碱基相对缺乏,而 A、T 含量高的普遍现象(郑芳等 2006)。克氏原螯虾 CO I 基因序列单倍型多样性和核苷酸多样性与其他水生生物相比具有较低的水平,属于种内变异较小的种群(傅洪拓等 2010,马克异

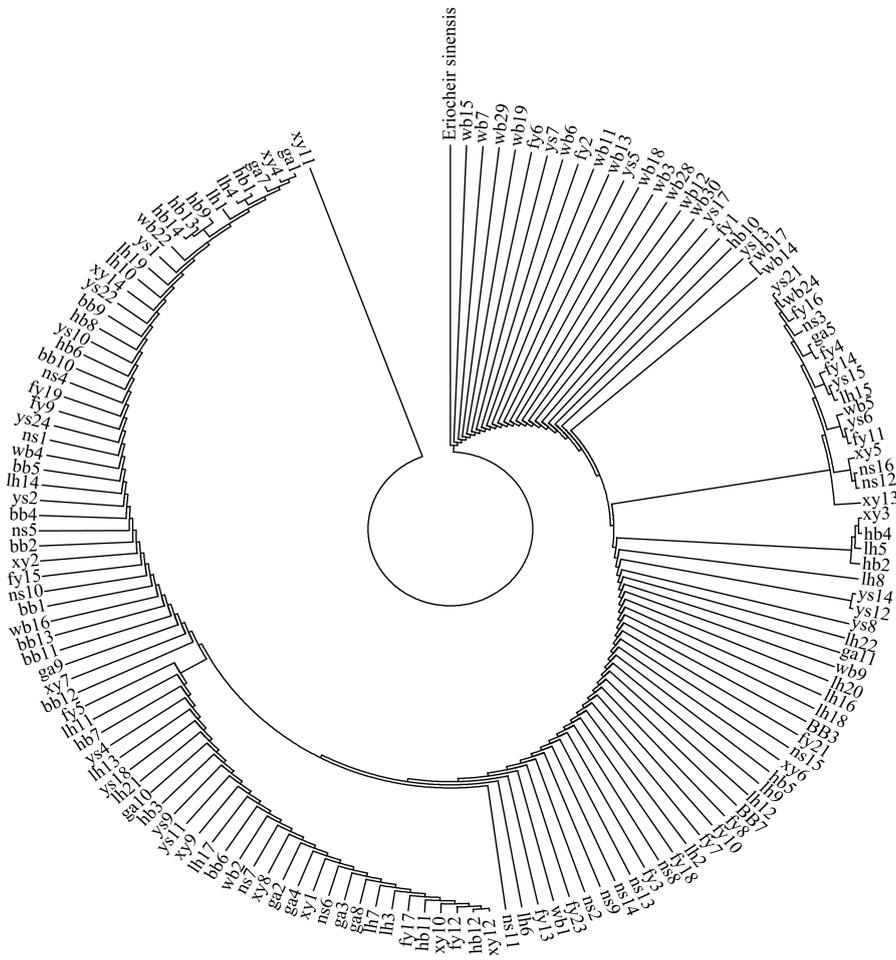


图2 克氏原螯虾种群 CO I 序列基因型 NJ 系统树

Fig. 2 The NJ tree of CO I sequence of Procambarus clarkii population

ga. 甘岸;hb. 淮滨;fy. 阜阳;ys. 颍上;wbh. 瓦埠湖;bb. 蚌埠;lh. 临淮关;nsh. 女山湖;xy. 盱眙;
 Eriocheir sinensis. 中华绒螯蟹 CO I 基因序列(序列号 HQ534048)为外群。

ga. Gan'an; hb. Huaibin; fy. Fuyang; ys. Yingshang; wbh. Wabu Lake; bb. Bengbu; lh. Linhuaiguan; nsh. Nvshan Lake;
 xy. Xuyi; Eriocheir sinensis. Eriocheir sinensis CO I gene sequence (HQ534048) was outgroup.

等 2011)。不同地理种群间遗传分化指数 (F_{st}) 是衡量种群间遗传差异的主要指标,同时也能反映亲缘关系的远近 (Benzie 1998)。遗传分化指数 (F_{st}) 表明淮河流域克氏原螯虾各地理种群间遗传分化较小(表 5),说明这些地理种群之间缺乏足够的遗传分化,基因交流较频繁。在本研究中,蚌埠种群和瓦埠湖种群之间的遗传变异较大 ($F_{st} = 0.458$),表明该两个地理种群间的遗传变异较大。基因流是种群遗传结构均质化的主要因素之一,具有高水平基因流的物种往往比具有低基因流的物种遗传分

化小 (Benzie et al. 1998)。在本研究中,淮河流域克氏原螯虾存在较高的基因交流频率 ($N_m = 2.955$),临淮关和女山湖种群间基因交流较为频繁 ($N_m = 11.114$),而蚌埠种群和瓦埠湖种群之间的基因流水平较低 ($N_m = 0.268$)。

生物种群的遗传多样性是评价生物资源状况的一个重要依据,它是物种适应多变的环境,维持长期生存和进化的遗传基础 (彭敏等 2012)。就某一物种而言,遗传多样性愈丰富,该物种对环境的适应能力就越强,其生存与进化潜力就愈大。一般认为种群遗传多样性是在

不断地适应环境和进化中形成的,是研究生物与环境相适应的重要内容(Medina et al. 2000, Frankham et al. 2001, Dirzo et al. 2008)。通常认为以异交为主的物种,90%的遗传变异发生在种群内部(曹玲亮等 2010, 黄羽等 2011)。本研究的 AMOVA 分析结果显示,克氏原螯虾种群的遗传变异主要来自于各个种群内部变异(92.20%),来自种群间的变异较少(7.80%),与上述结论一致。

克氏原螯虾由于具有较强的适应性,较容易适应新的环境,具有很强的扩散能力(王长忠等 2009)。从系统发育树上看,虽然系统关系较为无序,但是相同地理种群的多数个体仍聚在一起,由于本研究的采样点处于整个淮河水系,淮河水系为相对开放环境,使克氏原螯虾各地理种群间基因交流较为顺畅,加强了克氏原螯虾各地理种群之间的基因交流机会。

参 考 文 献

Barbaresi S, Fani R, Gherardi F, et al. 2003. Genetic variability in European populations of an invasive American crayfish: preliminary results. *Biological Invasions*, 5(3): 269–274.

Benzie J A H. 1998. Genetic structure of marine organisms and SE Asian biogeography // Hall R. *Biogeography and Geological Evolution of SE Asia*. The Netherlands: Backhuys Publishers, 197–209.

Boore J L. 1999. Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Research*, 27(8): 1767–1780.

Dawson M N, Jacobs D K. 2001. Molecular evidence for cryptic species of *Aurelia aurita* (Cnidaria: Scyphozoa). *The Biological Bulletin*, 200(1): 92–96.

Dawson M N. 2003. Macro-morphological variation among cryptic species of the moon jellyfish, *Aurelia* (Cnidaria: Scyphozoa). *Marine Biology*, 143(2): 369–379.

Dirzo R, Mendoza E. 2008. Biodiversity // Jorgensen S E, Fath B. *Encyclopedia of Ecology*. New York: Elsevier, 368–377.

Donald K M, Kennedy M, Spencer H G. 2005. The phylogeny and taxonomy of austral monodontine topshells (Mollusca: Gastropoda: Trochidae), inferred from DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 37(2): 474–483.

Frankham R, Gilligan D M, Morris D. 2001. Inbreeding and

extinction: effects of purging. *Conservation Genetics*, 2(3): 279–285.

Hedgecock D, Stelmach D J, Nelson K et al. 1979. Genetic divergence and biogeography of natural populations of *Macrobrachium rosenbergii*. *Proceedings of the World Mariculture Society*, 10(1/4): 873–879.

Medina M, Walsh P J. 2000. Molecular systematics of the order Anaspidia based on mitochondrial DNA sequence (12S, 16S and CO I). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 15(1): 41–58.

Palstra F P, O'Connell M F, Ruzzante D E. 2007. Population structure and gene flow reversals in Atlantic salmon (*Salmo salar*) over contemporary and long-term temporal scales: Effects of population size and life history. *Molecular Ecology*, 16(21): 4504–4522.

Yue G H, Li J L, Bai Z Y, et al. 2010. Genetic diversity and population structure of the invasive alien red swamp crayfish. *Biological Invasions*, 12(8): 2697–2706.

曹玲亮, 周立志, 张保卫. 2010. 安徽三大水系入侵物种克氏原螯虾的种群遗传格局. *生物多样性*, 18(4): 398–407.

傅洪拓, 乔慧, 李法君, 等. 2010. 长江不同江段青虾的遗传多样性. *水产学报*, 34(2): 204–212.

黄羽, 戴银根, 毕成武, 等. 2011. 长江中下游地区 6 个克氏原螯虾群体遗传多样性分析. *南昌大学学报: 工科版*, 33(2): 243–247.

姜叶琴. 2009. 虾类遗传多样性的研究现状. *海洋学研究*, 27(1): 83–89.

马克异, 冯建彬, 谢楠, 等. 2011. 钱塘江日本沼虾野生群体遗传变异的 SSR 分析. *动物学研究*, 32(4): 363–370.

彭敏, 陈秀荔, 蒋伟明, 等. 2012. 企鹅珍珠贝不同地理群体遗传多样性的 AFLP 分析. *水生生物学学报*, 36(1): 102–108.

祁得林, 晁燕, 郭松长, 等. 2008. 黄河裸裂尻鱼五种群 mtDNA 控制区的遗传结构. *动物学报*, 54(6): 972–980.

王长忠, 李忠, 梁宏伟, 等. 2009. 长江下游地区 4 个克氏原螯虾群体的遗传多样性分析. *生物多样性*, 17(5): 518–523.

项贤领, 席贻龙, 温新利, 等. 2010. 蓼花臂尾轮虫种复合体遗传分化的空间格局. *动物学研究*, 31(3): 205–220.

郑芳, 吕秀玲, 孙红英, 等. 2006. 基于线粒体 CO I 基因序列探讨长江溪蟹的遗传分化. *南京师大学报: 自然科学版*, 29(2): 103–105.