

## 山东省3个克氏原螯虾地理群体线粒体CO I基因的序列差异分析

杨玲, 李宁, 朱树人, 付佩胜, 张龙岗\*

(山东省淡水水产遗传育种重点实验室, 农业部黄河下游渔业资源环境科学观测实验站, 山东省淡水渔业研究院, 山东济南 250017)

**摘要** 利用PCR技术扩增山东境内的3个克氏原螯虾地理群体(济南小清河、东平湖和微山湖)CO I基因片段, 得到长度约为874bp的片段, 分析比较了3群体87尾克氏原螯虾CO I基因序列的变异和遗传结构。结果显示, 87条序列共检测到8个变异位点, 存在6种单倍型。单倍型多样性( $H$ )为0.174, 核苷酸多样性( $Pi$ )为0.0036, 单倍型多样性( $H$ )以东平湖群体最高(0.243), 微山湖群体其次(0.204), 小清河群体最低(0.000); 3群体的核苷酸多样性( $H$ )均较低( $<0.001$ )。分子变异等级分析(AMOVA)表明, 3群体间总的遗传分化指数( $Fst$ )为0.023 85( $P>0.05$ ), 群体间的遗传变异仅占总遗传变异的2.38%, 而97.62%的遗传变异源于群体内, 群体间遗传分化指数与遗传距离均较低。表明山东克氏原螯虾野生群体的遗传多样性较低, 具有较低的遗传分化水平。

**关键词** 克氏原螯虾; CO I; 遗传多样性

中图分类号 S917; Q958.1 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2015)20-041-04

Study on Genetic Diversity of Three *Procambarus clarkii* Populations of Shandong Province Based on CO I Gene Sequences

YANG Ling, LI Ning, ZHU Shu-ren, ZHANG Long-gang\* et al (Key Laboratory of Genetic and Breeding of Freshwater Aquaculture in Shandong Province, The Yellow River Downstream Fishery Resources and Environmental Science Observation Station, Freshwater Fishery Research Institute of Shandong Province, Jinan, Shandong 250017)

**Abstract** By PCR amplification, partial CO I sequences with an aligned length of 874 bp were obtained from 3 *Procambarus clarkii* geographical population (Xiaoqing River in Jinan, Dongping Lake and Weishan Lake) in Shandong Province. Variation and genetic structure of partial CO I sequences were analyzed from 87 individuals of these populations. A total of 6 haplotypes and 8 variable sites were detected. The highest haplotype diversity was in Dongping Lake population (0.243), while the lowest haplotype diversity was Xiaoqing River population (0.000). AMOVA showed that the FST among 3 population were 0.023 85 ( $P>0.05$ ). Genetic variation among populations accounted for only 2.38% of the total genetic variation, while 97.62% of genetic variation was from groups. Index of genetic differentiation and genetic distance between groups were lower. Results indicated that the genetic diversity of these 3 wild populations was low, and the 3 wild populations had lower genetic differentiation.

**Key words** *Procambarus clarkii*; CO I; Genetic diversity

克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*) 俗称小龙虾, 属螯虾科原螯虾属, 其肉味鲜美, 高蛋白低脂肪, 富含钙、磷、铁等矿物质, 深受消费者喜爱。现已广泛分布于我国中东部地区十余个省市, 成为一些湖泊和沟渠的优势种群<sup>[1]</sup>, 是我国重要的水产经济物种。分子标记是分析群体遗传多样性的一种有效手段, 学者利用 AFLP、SSR、ISSR、RAPD 等方法对克氏原螯虾群体的遗传多样性进行研究, 黄羽等<sup>[2]</sup>、宋亮等<sup>[3]</sup>利用 AFLP 方法进行克氏原螯虾遗传多样性分析, 揭示了长江中下游地区 6 个群体的遗传变异主要存在于群体内, 随州、济南、宁波和常熟 4 群体具有丰富的遗传多样性, 且群体间存在较明显的遗传分化; 王长忠等<sup>[4]</sup>、邢智珺等<sup>[5]</sup>利用 SSR 方法进行了克氏原螯虾遗传多样性分析, 揭示了长江 4 个群体遗传多样性处于中等水平, 江苏 8 个地理群体遗传多样性水平较高且群体间存在中度分化; 韩晓磊等<sup>[6]</sup>对 2 个克氏原螯虾群体遗传多样性进行了 ISSR 分析, 显示 2 野生群体存在一定程度的遗传分化, 遗传变异主要存在于群体内个体间; 张龙岗等<sup>[7]</sup>、张玮等<sup>[8]</sup>分别对克氏原螯虾不同野生群体进行了遗传差异的 RAPD 分析。利用线粒体细胞色素 C 氧化酶 I 亚基(CO I)基因对克氏原螯虾群体遗传多样性的研究相对较少, 笔者利用 CO I 基因对山东省内 3 个克氏原螯虾野

生地理群体的遗传多样性状况、遗传结构及遗传变异水平进行本底调查, 以期为其种群遗传多样性评估、种质资源保护和遗传育种提供分子生物学依据。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 克氏原螯虾分别采自于山东济南小清河(QH)、济宁微山湖(WS)和泰安东平湖(DP)的野生群体, 每组群体样本数量为 28~31 个; PCR 引物由上海生工生物技术有限公司合成; DNA 提取试剂盒(SK1206)购自上海生工生物技术有限公司; Taq DNA 聚合酶、dNTP、MgCl<sub>2</sub>、Marker 等为大连宝生物工程有限公司生产; PCR 仪为 Takara TP650 型。

## 1.2 方法

**1.2.1 基因组 DNA 的提取。**取克氏原螯虾肉约 20 mg, 用 DNA 提取试剂盒提取样品基因组 DNA, 经 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 比值和琼脂糖凝胶电泳检测浓度和纯度。

**1.2.2 引物设计及 PCR 扩增。**根据 GenBank(NC\_016926.1)中的相应序列, 设计并合成一对引物, 用于 CO I 基因序列的扩增, 引物序列为 CO I-S: 5'-ACGCAACGATGATTTTTTCT-3'; CO I-A: 5'-CATCCATCCCTACCGTAAATA-3'。

PCR 扩增体系 50 μl, 扩增条件: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 45 s, 51 °C 退火 50 s, 72 °C 延伸 50 s, 40 个循环; 72 °C 延伸 10 min。PCR 扩增产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测后, 送上海生工生物技术有限公司, 纯化后采用上述引物进行双向测序。

**基金项目** 山东省海洋与渔业厅科技计划项目; 山东省现代农业产业技术体系鱼类创新团队项目(SDAIT-14-011-03)。

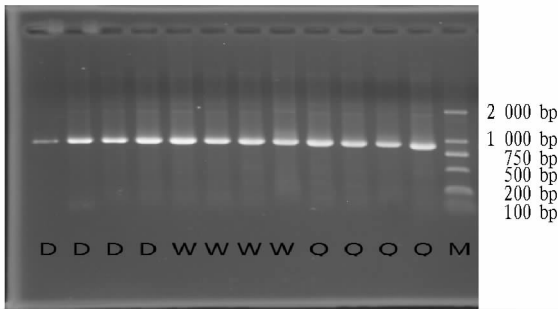
**作者简介** 杨玲(1967-), 女, 山东济南人, 研究员, 从事鱼类遗传育种研究。\* 通讯作者, 助理研究员, 硕士, 从事鱼类遗传育种研究。

**收稿日期** 2015-05-25

**1.2.3 序列分析。**所测得的 DNA 序列经 DNASTAR 软件拼接并辅以人工校,与从 GenBank 中下载的克氏原螯虾相应序列用 Clustal W 方法进行比对分析和确定长度,采用 MEGA 5.2 软件统计序列的碱基组成和转换/颠换比率( $Ts/Tv$  ratios)、变异位点,采用 Kimura 2-parameter 模型计算群体间的遗传距离,采用 Kimura 2-parameter 距离矩阵,邻接法(Neighbor-Joining, NJ)构建单倍型分子系统树,自举检测(bootstrap) 1000 次计算各分支置信度;用 DNASP V5 计算单倍型多样性指数(Hd)和核苷酸多样性指数( $\pi$ );使用 Arlequin3.5 软件中的分子变异分析(AMOVA)方法估算遗传变异在群体内和群体间的分布及遗传分化指数( $F$ -statistics,  $F_{st}$ )。

## 2 结果与分析

**2.1 PCR 扩增结果** 采用引物 CO I-S 和 CO I-A 对 3 个不同地理群体克氏原螯虾的基因组 DNA 进行 PCR 扩增,结果都扩增出一条约 900 bp 条带(图 1)。



注:D. 东平湖群体;W. 微山湖群体;Q. 小清河群体;M. Marker。

图 1 CO I 基因 PCR 产物电泳结果

## 2.2 CO I 基因片段的序列分析

**2.2.1 序列分析。**对克氏原螯虾 3 群体 87 个样本线粒体 CO I 基因进行了测序,结果经 DNASTAR 软件拼接并辅以人工校对,去除部分端序列后,获得 874 bp 的片段,经 BLAST 分析,与 GenBank (NC\_016926.1) 中的克氏原螯虾 CO I 基因片段同源性高达 99%,确定该产物为克氏原螯虾 CO I 基因的部分序列。

用 CLUSTAL-W 软件对测得序列及 GenBank 中 (NC\_016926.1) 的同源序列进行比对分析,共有 8 个变异位点(占位点总数的 0.9%),其中有 5 个转换(transition),3 个颠换(transversion),转换颠换比( $Ts/Tv$ )为 1.67:1.00,变异位点多发生在第 3 密码子上,没有碱基的插入与缺失。在编码的 296 个氨基酸序列中,有 1 处氨基酸替代,由密码子第一位点上的核苷酸替代引起。

87 个样本共检测到 6 种单倍型(表 1),其中 3 群体的共享单倍型 1 个(Hap-1),单倍型 Hap-2、Hap-3、Hap-4 为 DP 群体所特有,单倍型 Hap-5、Hap-6 为 WS 群体所特有,即 DP 群体拥有 4 种单倍型,WS 群体有 3 种单倍型,而 QH 群体只有 1 种单倍型。除共享单倍型外的 5 种单倍型出现频率较低,只有 1~2 个样本。

**2.2.2 碱基组成和遗传距离。**采用 MEGA 5.2 软件统计 3 个群体克氏原螯虾 CO I 基因部分序列的碱基组成和 G+C 含量(表 2)。G+C 含量(32.0%)显著低于 A+T 含量(68%),其中碱基 C 的含量最低,只有 12.1%,且在 1、2、3 位的含量变化很大,分别为 12.0%、23.4% 和 1.0%。DP 群体

表 1 克氏原螯虾 CO I 序列的核苷酸变异位点及各单倍型的分布

单倍型	变异位点								群体中数量			总和
	80	152	213	256	360	402	528	657	DP	WS	QH	
Hap-1	C	T	T	G	G	G	G	G	27	25	28	80
Hap-2	.	.	.	.	A	.	A	A	1			1
Hap-3	G	.	.	.	.	.	.	.	2			2
Hap-4	.	G	G	A	.	.	.	.	1			1
Hap-5	.	.	G	.	.	.	.	.		1		1
Hap-6	.	.	.	.	.	A	.	.		2		2

内的相对遗传距离(P-distance)为 0~0.007,WS 群体内的遗传距离为 0~0.002,QH 群体内的遗传距离为 0。

克氏原螯虾 CO I 基因 6 种单倍型序列间的遗传距离见

表 3,利用 Kimura 双参数模型计算,置信度估算采用 Kimura 的双参数法,重复数 1 000,结果显示各单倍型间的遗传距离在 0.001~0.007。

表 2 3 群体克氏原螯虾 CO I 基因片段的核苷酸组成

群体	T	C	A	G	Total	G+C//%	C-1	C-2	C-3	%
DP	41.1	12.1	26.9	19.9	874	32.0	12.0	23.3	1.0	
WS	41.1	12.1	26.9	19.9	874	32.0	12.0	23.4	1.0	
QH	41.1	12.1	26.9	19.9	874	32.0	12.0	23.4	1.0	
Avg	41.1	12.1	26.9	19.9	874	32.0	12.0	23.4	1.0	

**2.2.3 不同群体遗传多样性及遗传分化分析。**利用 DnaSP 5.1 软件进行 3 群体克氏原螯虾 CO I 基因遗传多样性分析(表 4),结果表明,DP 和 WS 群体具有较高的单倍型多样性

(Hd),分别为 0.243 和 0.204,而小清河群体单倍型多样性非常低,为 0。3 群体核苷酸多样性( $\pi$ )水平与平均核苷酸差异数(K)都较低。

表 3 克氏原螯虾 CO I 基因 6 种单倍型间的遗传距离

单倍型	Hap-1	Hap-2	Hap-3	Hap-4	Hap-5	Hap-6
Hap-1	-	0.002	0.001	0.002	0.001	0.001
Hap-2	0.003	-	0.002	0.003	0.002	0.002
Hap-3	0.001	0.005	-	0.002	0.002	0.002
Hap-4	0.003	0.007	0.005	-	0.002	0.002
Hap-5	0.001	0.005	0.002	0.002	-	0.002
Hap-6	0.001	0.005	0.002	0.005	0.002	-

分子变异等级分析 (AMOVA) 结果表明, 群体间遗传分化指数  $F_{st} = 0.02385$  ( $P > 0.05$ ), 表明在整个遗传变异中不

同群体间的遗传分化只占 2.38%, 其余 97.62% 的遗传分化来自群体内的个体间。群体间的遗传分化指数  $F_{st}$  及 3 群体间的遗传距离见表 5, 显示 3 群体间 DP 和 WS 间的遗传分化指数最低 ( $F_{st} = -0.00482$ ), DP 和 QH 群体间的遗传分化指数最高 ( $F_{st} = 0.05259$ ), 表明根据线粒体 CO I 基因的序列, 3 个群体中没有显著的遗传分化 ( $P > 0.05$ )。

从 3 群体间的遗传距离来看, DP 和 WS 群体的遗传距离最大 (0.00042), DP 和 QH 群体的遗传距离最小 (0.00012), 表明遗传距离与地理距离没有相关性。

表 4 3 个群体克氏原螯虾 CO I 基因遗传多样性

群体	样本数	单倍型数	单倍型多样性 (Hd)	核苷酸多样性 (Pi)	平均核苷酸差异数 (K)
DP	31	4	0.243 ± 0.099	0.00059 ± 0.00029	0.512 ± 0.197
WS	28	3	0.204 ± 0.098	0.00024 ± 0.00012	0.209 ± 0.069
QH	28	1	0.000	0.00000	0.000
总计	87	6	0.155 ± 0.053	0.00029 ± 0.00012	0.251 ± 0.082

表 5 克氏原螯虾群体间的遗传分化指数  $F_{st}$  (对角线下) 及遗传距离 (对角线上)

群体	DP	WS	QH
DP	-	0.00042	0.00012
WS	-0.00482	-	0.00030
QH	0.05259	0.04938	-

2.2.4 系统发育和聚类分析。根据 6 个单倍型序列和 GenBank 中检索的同源序列 (NC\_016926.1), 采用双参数模型 (Kimura 2-parameter) 作为距离参数, 邻接法 (neighbor-joining, NJ) 构建系统进化树, 自举检测 (bootstrap) 1000 次计算各分支置信度 (图 2)。由图 2 可知, Hap-1、Hap-2 和 GenBank 汇成一支, 另外 4 个单倍型汇成一支, 可以看出 DP 群体拥有的 4 种单倍型在各分支上都有分布, 各群体间存在较为广泛的共享单倍型, 未表现出明显的地理位置与单倍型之间的对应关系。

利用 MEGA 5.2 软件构建了 87 个克氏原螯虾个体的 UPGMA 系统进化树 (图 3), 也揭示了克氏原螯虾山东 3 群体不是按照地理位置形成对应族群的, 绝大多数个体聚为一大类后和 WS 群体的部分个体群聚为一支, DP 群体的部分个体自成一支。

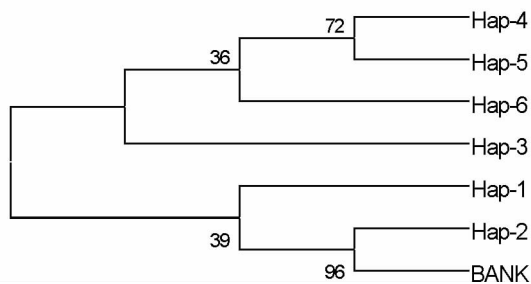


图 2 基于 CO I 基因单倍型构建的系统树

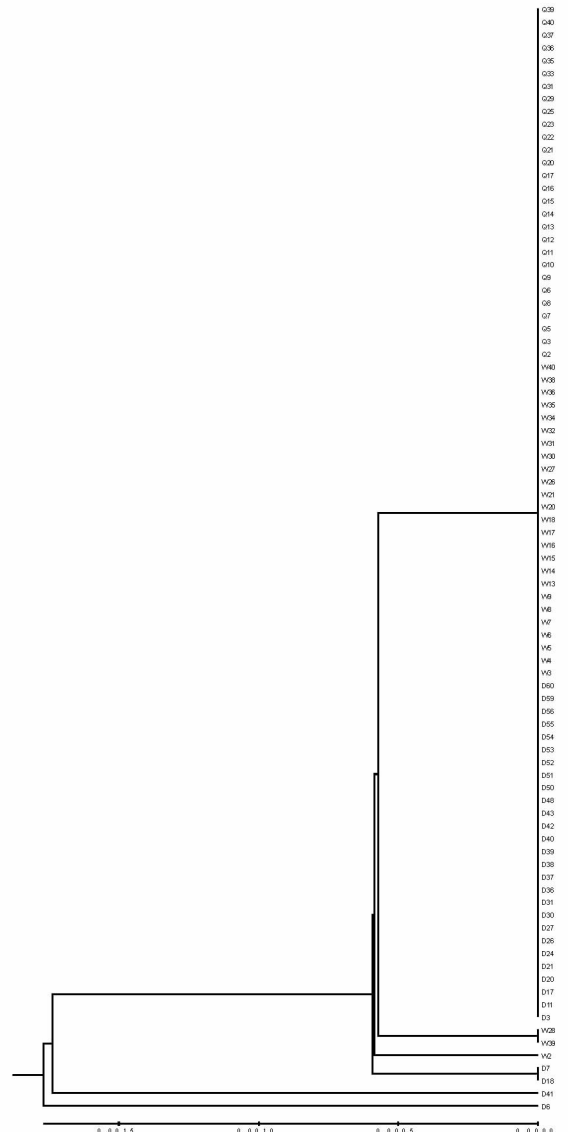


图 3 87 个克氏原螯虾个体的 UPGMA 系统进化树

### 3 讨论

动物线粒体 CO I 基因进化速度较快, 适合种群水平差异

的检测,也可用于种间分析,彭士明等<sup>[9]</sup>、马凌波等<sup>[10]</sup>、姜虎成等<sup>[11]</sup>、朱立静等<sup>[12]</sup>通过分析银鲌、青蟹、日本沼虾、四角蛤喇等物种群体的线粒体 *CO I* 基因序列差异研究其遗传结构和系统演化。该研究通过分析山东 3 个不同地理群体克氏原螯虾 *CO I* 基因序列的差异来探讨其遗传结构、遗传分化和进化关系。

**3.1 遗传多样性** 种群内和种群间的遗传多样性水平是反映物种遗传背景的科学资料,该研究表明,在克氏原螯虾 3 群体 87 个样本扩增的 *CO I* 基因 874 bp 片段中,存在 8 个突变位点,有 6 种单倍型。3 群体核苷酸多样性 ( $P_i$ ) 为  $0.000\ 29 \pm 0.000\ 12$ , 平均核苷酸差异数 ( $K$ )  $0.251 \pm 0.082$ 。单倍型多样性分析表明,DP 和 WS 群体较高,QH 群体最低,与张龙岗等<sup>[7]</sup>研究的群体遗传多样性为  $WS > DP > QH$  的 RAPD 分析结果相似。总体而言,3 群体的遗传多样性处于较低的水平,各群体间存在较为广泛的共享单倍型,未表现出明显的地理位置与单倍型之间的对应关系。这是因为克氏原螯虾为外来物种,因奠基者效应或瓶颈效应的影响,由于克氏原螯虾适应环境的能力非常强,环境的选择压力对其影响不大,形成基因突变和重组的概率很小,也未见由国外多次引入的报道,故其遗传多样性增加的可能性微乎其微,故而呈现出遗传多样性降低的现象。相对而言,DP 和 WS 群体的遗传多样性水平比 QH 群体高,这是因为东平湖和微山湖一带小龙虾养殖业发展迅猛,和长江流域存在基因交流,人为因素使得其遗传多样性水平相对较高;而 QH 群体因生存环境相对封闭,克氏原螯虾定居性较强,游泳能力弱,自身迁徙能力差,与其他群体缺乏交流,加之近些年过度捕捞,造成自然资源锐减和种群内近亲交配,导致遗传多样性水平逐渐降低。王长忠等<sup>[4]</sup>利用 AFLP 技术进行研究,结果表明,克氏原螯虾群体遗传多样性为宁波群体 > 随州群体 > 济南群体 > 常熟群体,也证明济南群体处于较低的遗传多样性水平。

**3.2 遗传分化** AMOVA 分析的  $F_{st}$  值是用来测量群体间遗传分化的指标, $F_{st}$  值越小说明群体间发生遗传分化越低,一般认为  $F_{st} < 0.05$  认为遗传分化程度很小; $0.05 < F_{st} < 0.25$  认为是中等程度的遗传分化;而  $F_{st} > 0.25$  表示有显著差异。该研究中群体间  $F_{st} = 0.023\ 85$  ( $P > 0.05$ ),表明群体间的遗传分化程度较低,在整个遗传变异中群体间占 2.38%,其余的遗传变异来自于群体内,3 个群体中 DP 和 QH 间的  $F_{st}$  值最大(0.052 59),两者间的遗传分化最大,DP

和 WS 间的  $F_{st}$  最小(-0.004 82),即两者间的遗传分化最小,与张龙岗等<sup>[7]</sup>的研究结果类似。DP 和 WS 群体间的遗传距离最大,DP 和 QH 群体间的遗传距离最小(0.000 12),可能与 DP 和 WS 群体 *CO I* 基因具有独有单倍型有关,导致遗传分化大的遗传距离反而小。很多情况下,遗传分化大的 2 个群体间遗传距离不一定最大<sup>[13]</sup>,群体间  $F_{st}$  值虽然大小与其趋势不一致,但该研究  $F_{st}$  值都不显著,说明 3 个群体间不存在遗传分化,这个  $F_{st}$  和遗传距离不是对应的。

UPGMA 系统关系树也反映出它们的系统进化情况,绝大多数个体聚为一大类后和 WS 群体的部分个体群聚为一支,DP 群体的部分个体自成一类,由此推测,可能东平湖群体更接近于外来原始种群,微山湖群体和小清河群体由东平湖群体演化而来。

该研究山东 3 个克氏原螯虾野生群体间的遗传分化较低,群体间还没有形成互相隔离的遗传结构,鉴于此,在克氏原螯虾选育过程中,应以东平湖群体作为基础群体,并适当引进外地良种,以获得更多遗传多样性水平,促进克氏原螯虾养殖业的健康发展。

#### 参考文献

- [1] 王卫民. 软壳克氏原螯虾在我国开发利用前景[J]. 水生生物学报, 1999, 23(4): 375-381.
- [2] 黄羽, 戴银根, 毕成武, 等. 长江中下游地区 6 个克氏原螯虾群体遗传多样性分析[J]. 南昌大学学报, 2011, 33(3): 243-247.
- [3] 宋亮, 韩晓磊, 夏蝉, 等. 不同地区克氏原螯虾遗传多样性的 AFLP 分析[J]. 江苏农业学报, 2012, 28(2): 359-364.
- [4] 王长忠, 李忠, 梁宏伟, 等. 长江下游地区 4 个克氏原螯虾群体的遗传多样性分析[J]. 生物多样性, 2009, 17(5): 518-523.
- [5] 邢智理, 江虎成, 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): 656-661.
- [6] 韩晓磊, 徐松维, 李小蕊, 等. 克氏原螯虾群体遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 江苏农业科学, 2011, 39(4): 26-29.
- [7] 张龙岗, 杨玲, 刘羽清, 等. 山东克氏原螯虾 3 个地理群体遗传差异的 RAPD 分析[J]. 长江大学学报, 2014, 11(17): 37-40.
- [8] 张玮, 阮龙, 陈义红, 等. 克氏原螯虾 4 个地理群体遗传差异的 RAPD 分析[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(22): 11861-11862, 11876.
- [9] 彭士明, 施兆鸿, 侯俊利, 等. 银鲌 3 个野生群体线粒体 *CO I* 基因的序列差异分析[J]. 上海海洋大学学报, 2009, 18(4): 398-402.
- [10] 马凌波, 张凤英, 乔振国, 等. 中国东南沿海青蟹线粒体 *CO I* 基因部分序列分析[J]. 水产学报, 2006, 30(4): 463-467.
- [11] 姜虎成, 冯建彬, 丁怀宇, 等. 淮河水系日本沼虾群体遗传结构和系统演化的线粒体 *CO I* 序列分析[J]. 动物学杂志, 2012, 47(2): 73-84.
- [12] 朱立静, 陈淑吟, 许晓凤, 等. 四角蛤喇江苏群体线粒体 *CO I* 基因片段序列研究[J]. 江苏农业科学, 2010, 38(4): 33-35, 97.
- [13] 张东亚, 汪登强, 刘绍平, 等. 怒江频危鱼类缺须唇鱼基于线粒体 *Cyt b* 序列的群体遗传结构分析[J]. 中国水产科学, 2009, 16(4): 477-485.

## 科技论文写作规范——引言

扼要地概述研究工作的目的、范围、相关领域的前人工作和知识空白、理论基础和分析、研究设想、研究方法和实验设计、预期结果和意义等。一般文字不宜太长,不需作详尽的文献综述。在最后引出文章的目的及试验设计等。“引言”两字省略。