

文章编号: 1674 - 5566(2014)05 - 0656 - 07

## 江苏 8 个克氏原螯虾群体遗传多样性微卫星分析

邢智璐<sup>1</sup>, 姜虎成<sup>1</sup>, 陆伟<sup>2</sup>, 钱照君<sup>1</sup>, 于宏伟<sup>2</sup>, 李家乐<sup>1</sup>

(1. 上海海洋大学 农业部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306; 2. 江苏省盱眙满江红龙虾产业园有限公司, 江苏 盱眙 211700)

**摘要:** 利用 8 个微卫星标记分析了江苏省 8 个地区(大浦、平望、漆塘、官滩、西顺河、太平、固城、洋河滩)克氏原螯虾的遗传多样性。研究表明: 8 个群体全部 64 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。8 个群体中大浦群体遗传多样性水平最高, 平望群体遗传多样性水平最低。群体间遗传分化指数  $F_{ST}$  及 AMOVA 分析表明, 8 个群体遗传分化指数为 0.126, 存在中等程度的分化 ( $0.05 < F_{ST} < 0.15$ )。基于遗传距离构建的 UPGMA 聚类树显示, 8 个群体可分为 4 组: 平望群体、漆塘群体和大浦群体聚为一组, 太平群体、西顺河群体与官滩群体聚为一组, 而固城群体、洋河滩群体分别自成一组。

**研究亮点:** 首次分析了我国江苏省 8 个主要产区的克氏原螯虾群体的遗传多样性, 发现江苏克氏原螯虾野生群体遗传多样性较高并且群体间存在中度分化, 这为我国克氏原螯虾种质资源保护及遗传育种研究提供了参考资料。

**关键词:** 克氏原螯虾; 遗传多样性; 江苏; 微卫星

**中图分类号:** S 917

**文献标志码:** A

克氏原螯虾 (*Procambarus clarkii*) 原产于美洲, 1929 年由日本引入我国南京附近<sup>[1]</sup>, 现已广泛分布于我国各主要淡水水体, 尤其在长江中下游流域, 已成为重要的经济物种之一<sup>[2-4]</sup>。江苏省是我国克氏原螯虾的主要养殖省份之一, 也是我国最早食用并将其进行产业化开发利用的省份, 特别是盱眙龙虾更是闻名中外<sup>[5]</sup>。2010 年上半年随着江苏省水产三项工程克氏原螯虾项目的全面实施和积极引导, 克氏原螯虾人工养殖产业发展又上了一个台阶, 养殖面积达到了 130  $\text{hm}^2$ <sup>[6]</sup>。然而, 多年来人工养殖不注重亲本选育, 造成了严重的种质退化, 制约了克氏原螯虾养殖业的发展<sup>[7-8]</sup>。

微卫星标记作为高多态性共显性的标记<sup>[9]</sup>, 已广泛应用于甲壳动物群体遗传学、种质鉴定等研究<sup>[10-12]</sup>, 国内外也早已采用微卫星标记分析了克氏原螯虾野生群体的遗传结构<sup>[13-18]</sup>。目前,

仍未见我国具体主要养殖省份的克氏原螯虾种质资源现状的报道。因此, 进行江苏省克氏原螯虾种质资源的研究对其野生资源的有效保护和合理利用具有重要的理论与应用价值。本研究通过微卫星标记方法分析江苏省 8 个地区克氏原螯虾群体的遗传多样性和种质资源现状, 以期对克氏原螯虾种质资源保护及遗传育种研究提供参考资料。

### 1 材料与方法

#### 1.1 样本来源及 DNA 提取

2013 年 5 - 7 月, 在江苏省境内采集了 8 个克氏原螯虾群体, 具体信息见表 1, 剪取虾体腹部肌肉后用无水乙醇固定, 利用苯酚/氯仿法<sup>[19]</sup>提取基因组 DNA, TE (pH 8.0) 溶解, 测定质量后, -20 °C 保存备用。

收稿日期: 2014-03-21 修回日期: 2014-04-16

基金项目: 上海市知识服务平台项目 (ZF1206); 上海市科学技术委员会工程技术研究中心能力提升项目 (13DZ2280500)

作者简介: 邢智璐 (1989—), 女, 硕士研究生, 研究方向为水产动物种质资源与种苗工程。E-mail: keldorn0722@gmail.com

通信作者: 李家乐, E-mail: jlli@shou.edu.cn

表 1 克氏原螯虾样本采集位置及样本数

Tab. 1 Sample sites and number of *Procambarus clarkii*

群体	采集地	地理位置	样本数
大浦 DP	江苏省宜兴市大浦镇	31°19'N 119°52'E	60
平望 PW	江苏省苏州市平望镇	30°58'N 120°38'E	60
漆塘 QT	江苏省无锡市大浮镇	31°30'N 120°14'E	60
官滩 GT	江苏省淮安市官滩镇	33°05'N 118°34'E	60
西顺河 XS	江苏省淮安市西顺河镇	33°11'N 118°35'E	60
太平 TP	江苏省宿迁市太平镇	33°27'N 118°31'E	60
固城 GC	江苏省南京市固城镇	31°17'N 118°55'E	60
洋河滩 YH	江苏省宿迁市晓店镇	34°0'N 118°14'E	60

## 1.2 微卫星反应

从本实验室自行开发的克氏原螯虾转录组

文库中筛选出多态性较好的 8 对微卫星引物,具体信息见表 2,PCR 反应体系为 10  $\mu$ L,包括:1  $\times$  PCR buffer,1.5 mmol/L  $Mg^{2+}$ ,200  $\mu$ mol/L dNTP,200  $\mu$ mol/L 上下游引物,0.1U *Taq* 酶,100 ng 模板,灭菌去离子水补齐。

PCR 反应步骤为:94  $^{\circ}$ C 变性 2 min;94  $^{\circ}$ C 变性 30 s,  $T_m$ (melting temperature) 复性 30 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 30 s,共进行 35 个循环;72  $^{\circ}$ C 10 min;4  $^{\circ}$ C 保存。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖电泳初检合格后,用 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,用 PUC18 DNA /*Msp* I 作为标准分子量,快速银染法染色<sup>[20]</sup>,扫描后观察分析。

表 2 克氏原螯虾 8 对微卫星引物

Tab. 2 Primers of 8 microsatellites DNA in *Procambarus clarkii*

位点名称	重复序列	引物序列(5' - 3')	复性温度/ $^{\circ}$ C	GenBank 登录号
PCSH07	(AG) <sub>11</sub>	F: ATTTGACAGCATAAATCATTGGC R: TGTACTGTCCACTTGTGGTTG	55	KJ607977
PCSH38	(TG) <sub>12</sub>	F: CAGAGCACTGTTTGTACTGTCT R: ACTCCTTGACGCTTAACTGTGG	60	KJ607979
PCSH42	(TGC) <sub>13</sub>	F: AGTGACTCTTTACTGATCGCTCG R: TTAGTGAGGAAGAGGAACTGGTG	55	KJ607980
PCSH47	(GT) <sub>24</sub>	F: CAAGAATATTGTTTCATAAATACATTGC R: TACGAAGCCAATAGATACGGAAA	55	KJ607981
PCSH52	(ATC) <sub>9</sub>	F: ATTTGACAGCATAAATCATTGGC R: ACTACCTAAAATGATGACGCCAA	55	KJ607982
PCSH54	(TG) <sub>10</sub>	F: TTGTAACAAATGTTTTCTGTGTGC R: TGG AAGCACTAGCACTACCTTTC	55	KJ607983
PCSH77	(TC) <sub>11</sub>	F: GGGATAGCACAATACACTCATCC R: GGGTGCTATGCATCACATTA AAA	60	KJ607986
PCSH89	(AGC) <sub>7</sub>	F: GTATACACAGCTTTGGAAGTGGG R: GCTTCCTCTGTTATTCATCATGC	55	KJ607988

## 1.3 数据分析

根据条带位置确定基因型,利用 POPGENE32 软件计算等位基因数( $A$ )、有效等位基因数( $N_e$ )、观测杂合度( $H_o$ )、期望杂合度( $H_e$ )、遗传相似系数( $I$ )及 Nei's 遗传距离( $D_A$ )。用 BOTSTEIN 等<sup>[21]</sup>的公式计算微卫星位点多态信息含量( $PIC$ ),利用马尔可夫链(Markov chain)方法进行 Hardy-Weinberg 平衡检验,采用 Bonferroni 方法校正的显著性标准,根据  $P$  值判断杂合缺失或过剩。利用 ARLEQUIN3.1<sup>[22]</sup>计算群体遗传分化指数( $F_{ST}$ )及基因流( $N_m$ )并进行分子方差分析(AMOVA)。并基于遗传距离用 Mega

4.0 构建 UPGMA 系统进化树<sup>[23]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 种群遗传多样性分析

8 对微卫星引物在 8 个群体中均得到了较好的扩增,扩增结果如表 3 所示,等位基因数( $A$ )介于 4 ~ 12 之间,有效等位基因数( $N_e$ )介于 1.58 ~ 5.18 之间,观测杂合度( $H_o$ )介于 0.152 ~ 0.537 之间,期望杂合度( $H_e$ )介于 0.369 ~ 0.808 之间,多态信息含量( $PIC$ )介于 0.381 ~ 0.795 之间。除 PCSH77 为中度多态位点外,其余均为高度多态位点<sup>[24]</sup>,可有效进行后续分析。

表3 克氏原螯虾8个微卫星位点有效等位基因数、杂合度及多态信息含量  
 Tab.3 Statistics of number of effective alleles, expected and observed heterozygosity and polymorphism information content for *Procambarus clarkii*

位点	等位基因数 $A$	有效等位基因数 $N_e$	观测杂合度 $H_o$	期望杂合度 $H_e$	多态信息含量 $PIC$
PCSH07	12	5.18	0.220	0.808	0.795
PCSH38	11	3.60	0.383	0.723	0.679
PCSH42	8	2.65	0.354	0.623	0.603
PCSH47	10	4.51	0.388	0.779	0.750
PCSH52	7	3.57	0.537	0.721	0.684
PCSH54	8	3.38	0.379	0.705	0.665
PCSH77	6	1.58	0.152	0.369	0.381
PCSH89	4	2.94	0.254	0.660	0.584
平均值	8.25	3.43	0.334	0.673	0.642

8个克氏原螯虾群体的遗传多样性参数如表4所示。8个群体中,大浦群体平均等位基因数最大( $A=6.50$ ),平望群体最小( $A=3.75$ );大浦群体平均期望杂合度( $H_e=0.666$ )最大,固城群体最小( $H_e=0.496$ ),10个群体的平均观测杂合度均小于平均期望杂合度。由此可知,大浦、漆塘、太平群体遗传多样性较高,而固城、平望、洋

河滩群体相对较低。

显著性标准经 Bonferroni 校正后,利用 Hardy-Weinberg 平衡检验对8个群体中所有位点基因平衡状态进行检验,如表4所示:8个群体的全部64个位点均显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡。此外,除平望的 PCSH52 位点外,其余位点组合均表现为杂合子缺失。

表4 克氏原螯虾群体微卫星遗传多样性  
 Tab.4 Summary statistics analysis of genetic diversity of *Procambarus clarkii*

位点	指数	PCSH07	PCSH38	PCSH42	PCSH47	PCSH52	PCSH54	PCSH77	PCSH89	平均值
DP	$A$	12	8	6	7	6	4	5	4	6.50
	$H_o$	0.284	0.271	0.322	0.631	0.593	0.288	0.050	0.203	0.330
	$H_e$	0.847	0.520	0.578	0.801	0.775	0.686	0.465	0.653	0.666
PW	$A$	4	3	4	4	5	4	3	3	3.75
	$H_o$	0.216	0.333	0.300	0.316	0.745	0.275	0.033	0.288	0.313
	$H_e$	0.515	0.626	0.411	0.635	0.695	0.516	0.268	0.628	0.537
QT	$A$	4	9	4	8	5	4	4	3	5.13
	$H_o$	0.178	0.803	0.379	0.741	0.527	0.457	0.185	0.071	0.418
	$H_e$	0.685	0.806	0.482	0.813	0.701	0.632	0.297	0.650	0.634
GT	$A$	5	8	5	6	5	4	4	3	5.00
	$H_o$	0.190	0.636	0.187	0.159	0.561	0.319	0.208	0.446	0.338
	$H_e$	0.682	0.730	0.610	0.674	0.675	0.632	0.259	0.657	0.614
XS	$A$	4	9	6	7	5	4	4	3	5.25
	$H_o$	0.060	0.266	0.517	0.302	0.400	0.421	0.187	0.155	0.288
	$H_e$	0.527	0.595	0.752	0.779	0.647	0.565	0.247	0.638	0.594
TP	$A$	5	8	6	5	4	7	3	3	5.13
	$H_o$	0.389	0.238	0.416	0.438	0.603	0.844	0.087	0.293	0.414
	$H_e$	0.675	0.753	0.641	0.598	0.665	0.793	0.180	0.664	0.621
GC	$A$	5	5	4	4	4	3	4	3	4.00
	$H_o$	0.125	0.300	0.150	0.282	0.225	0.153	0.325	0.225	0.223
	$H_e$	0.330	0.668	0.443	0.330	0.519	0.566	0.499	0.610	0.496
YH	$A$	4	4	5	4	5	4	3	3	4.00
	$H_o$	0.250	0.208	0.500	0.065	0.531	0.148	0.239	0.404	0.293
	$H_e$	0.341	0.595	0.631	0.584	0.680	0.544	0.542	0.666	0.573

## 2.2 种群遗传分化分析

克氏原螯虾 8 个群体基因流 ( $N_m$ ) 及群体遗传分化指数 ( $F_{ST}$ ) 见表 5。各群体间基因流在 0.880 ~ 18.833 之间,群体遗传分化指数在 0.013 ~ 0.221 之间。结果显示,漆塘与大浦群体间基因流水平最高 ( $N_m = 18.833$ ),遗传分化指数最小 ( $F_{ST} = 0.013$ ),说明两群体间存在广泛的基

因交流 ( $N_m > 4$ ),群体间遗传分化较小 ( $F_{ST} < 0.05$ )<sup>[25]</sup>,两群体间是一随机交配的群;西顺河群体与固城群体间基因流水平最低 ( $N_m = 0.880$ ),遗传分化指数最高 ( $F_{ST} = 0.221$ ),说明两群体间基因交流较为匮乏,群体间存在显著遗传分化 ( $F_{ST} > 0.15$ )。

表 5 克氏原螯虾 8 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. 5 Gene flow ( $N_m$ , above diagonal) and genetic diversity ( $F_{ST}$ , below diagonal) in 8 *Procambarus clarkii* stocks

	DP	PW	QT	GT	XS	TP	GC	YH
DP		3.070	12.977	18.833	3.693	2.712	4.761	5.688
PW	0.075		15.879	2.494	0.880	1.288	10.388	2.684
QT	0.018	0.015		6.713	1.689	1.877	15.182	4.883
GT	0.013	0.091	0.035		4.388	2.441	2.906	7.514
XS	0.063	0.221	0.128	0.053		2.086	1.035	2.464
TP	0.084	0.162	0.117	0.092	0.107		1.573	2.160
GC	0.049	0.023	0.016	0.079	0.194	0.137		2.006
YH	0.042	0.085	0.048	0.032	0.092	0.103	0.110	

克氏原螯虾 8 个群体遗传相似系数和遗传距离见表 6。本研究中,各群体间遗传相似系数 ( $I$ ) 为 0.542 ~ 0.930,遗传距离 ( $D_A$ ) 为 0.071 ~ 0.611,结果显示,西顺河群体与固城群体的遗传距离最大,而西顺河群体与官滩群体的遗传距离

最小。8 个群体间遗传变异的 AMOVA 分析结果如表 7 所示,8 个群体间遗传变异占总变异量的 8.31%,而 91.70% 的遗传变异来自群体内变异,群体间遗传分化达到极显著水平 ( $P < 0.01$ )。

表 6 克氏原螯虾 8 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. 6 Genetic similarity indices ( $I$ , above the diagonal) and genetic distances ( $D_A$ , below the diagonal) among 8 stocks of *Procambarus clarkii*

	DP	PW	QT	GT	XS	TP	GC	YH
DP		0.773	0.879	0.830	0.817	0.750	0.695	0.715
PW	0.256		0.897	0.838	0.669	0.727	0.796	0.782
QT	0.128	0.108		0.904	0.823	0.816	0.742	0.811
GT	0.185	0.176	0.100		0.930	0.854	0.724	0.831
XS	0.201	0.401	0.193	0.071		0.830	0.542	0.739
TP	0.287	0.318	0.202	0.156	0.185		0.723	0.650
GC	0.363	0.227	0.297	0.322	0.611	0.324		0.552
YH	0.334	0.245	0.208	0.184	0.301	0.430	0.593	

表 7 江苏克氏原螯虾群体分子方差分析

Tab. 7 AMOVA analysis among *Procambarus clarkii* stocks in Jiangsu Province

变异来源	自由度	平方和	方差组分	方差比例/%
群体间	7	69.714	0.079 9	8.31
群体内个体间	427	547.375	0.399 0	41.44
个体内	435	210.500	0.483 9	50.26
总变异	869	827.589	0.962 9	

构建 UPGMA 系统树,结果如图 1 所示。8 个群体可分为 4 组:平望群体、漆塘群体和大浦群体聚为一组,太平群体、西顺河群体与官滩群体聚为一组,而固城群体、洋河滩群体分别自成一组。

## 3 讨论

### 3.1 种群遗传多样性

本研究选用的 8 个微卫星位点多态信息含量 ( $PIC$ ) 介于 0.381 ~ 0.795 之间,均为中高度多

基于 Nei's 遗传距离对克氏原螯虾 8 个群体

态位点,因此可较好地分析遗传结构和多样性。杂合度能反映各群体在多个位点上的遗传变异,因此这些标记用于克氏原螯虾遗传多样性分析效果较好。

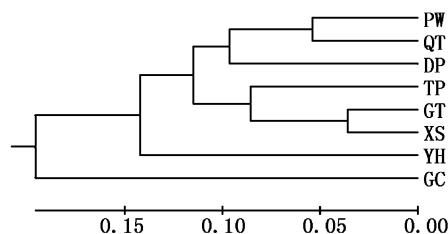


图1 基于 Nei's 遗传距离的 UPGMA 聚类树  
Fig. 1 UPGMA clustering tree based on Nei's genetic distance

杂合度能反映各群体在多个位点上的遗传变异,是度量群体遗传变异的一个最适参数<sup>[26]</sup>。本研究中,8个克氏原螯虾群体在8个微卫星位点上的平均期望杂合度值为0.673,与以往报道过的结果相比,高于江西南昌群体及安徽合肥群体的总体期望杂合度为0.592<sup>[14]</sup>,低于部分安徽地区(安徽9个地区总体期望杂合度为0.78)<sup>[15]</sup>及原产地种群(总体期望杂合度为0.78)<sup>[27]</sup>。总体而言,本研究涉及的8个克氏原螯虾种群遗传多样性较高,克氏原螯虾作为入侵物种,具有较高的遗传多样性的原因可能是:(1)首次引入的数量较大或存在由不同遗传背景群体的多次引入;(2)入侵后在繁殖过程中产生了迅速的遗传变异,使得种群具有较高的遗传多样性。

### 3.2 Hardy-Weinberg 平衡

本研究中8个群体所有64个位点均显著偏离了 Hardy-Weinberg 平衡,同时除平望的 PCSH52 位点外,其余位点组合均表现为杂合子缺失,这可能是造成群体偏离 Hardy-Weinberg 平衡的主要原因。此外,绝大多数位点显示杂合不足,是由于(1)目前野生克氏原螯虾捕捞压力不断增加,导致稀有等位基因的丢失;(2)克氏原螯虾的繁殖能力较强<sup>[28]</sup>,为保证子代较高的成活率,幼虾会附着于母体腹部一段时间且脱离母体后仍会在母体周围一段时间<sup>[29]</sup>,会造成亲缘相近的克氏原螯虾个体间发生交配现象<sup>[30]</sup>;(3)雌性克氏原螯虾在繁殖期常与多个雄性个体交配且所产后代也来源于不同的雄性个体,而这种现象也在其他淡水螯虾中被发现<sup>[31]</sup>。

### 3.3 种群遗传分化

种群基因交流( $N_m$ )通常用来表示种群间基因交流程度,本研究中8个群体种群基因交流( $N_m$ )平均值为5.153且均大于1,说明8个群体间基因流的水平较高,群体间的遗传分化较小,其中部分群体间是同一随机交配的群体;遗传分化系数( $F_{ST}$ )是反映各个群体间遗传分化的重要指标,本研究中,8个群体遗传分化系数( $F_{ST}$ )为0.126,说明各群体间普遍存在中度分化( $0.05 < F_{ST} < 0.15$ ),8个群体克氏原螯虾群体存在广泛的基因交流及中等程度的遗传分化,虽然克氏原螯虾的游泳能力较弱,多数时间攀附于水草或栖息于自行挖掘的洞穴内<sup>[32]</sup>,但是随着国内消费热潮及克氏原螯虾养殖产业兴起,其消费群体迅速扩大,全国现已有数十万农渔民以此为业,克氏原螯虾已成为我国水产养殖业中发展最具特色、最具潜力的养殖新品种,养殖面积逐步扩大,产量和效益逐步提高<sup>[6]</sup>,而江苏又是我国克氏原螯虾主要产区,由人为因素引起的克氏原螯虾在8个群体间彼此相互交流的机会或次数较多,因而产生了广泛的基因交流。

8个克氏原螯虾群体的遗传相似系数( $I$ )、遗传距离( $D_A$ )和 UPGMA 系统关系树也反映了它们的相对地理位置及系统进化情况。除固城群体外,其余7个地区克氏原螯虾群体亲缘关系的远近与其地理分布大致相符。同属太湖的大浦群体、平望群体、漆塘群体聚为一组;同属洪泽湖的官滩群体、太平群体、西顺河群体聚为一组;而固城群体、洋河滩群体分别自成一组。其中固城群体与其余7个群体的遗传距离普遍较远,独自聚为一支的主要原因为:固城湖原为水阳江的过水性湖泊,后转变为相对封闭的水库型湖泊<sup>[33]</sup>,因而固城群体成为一个封闭群体,与其他群体交流相对较少并与其他群体亲缘关系较远。太湖、洪泽湖、骆马湖则通过京杭运河、长江及其支流相连,因而这3个湖泊间克氏原螯虾群体交流相对于它们与固城群体间的交流简单且易发。

### 参考文献:

- [1] 李家乐,董志国,李应森,等.中国外来水生动物植物[M].上海:上海科学技术出版社,2007.
- [2] 李振宇,解焱.中国外来入侵种[M].北京:中国林业出版社,2002.
- [3] 夏爱军,唐建清.克氏原螯虾现状分析与研究思路[J].

- 水产养殖, 2007, 27(6): 9-11.
- [4] 卢亚芳. 中国淡水虾蟹养殖业的现状[J]. 淡水渔业, 2002, 32(6): 57-58.
- [5] 戈兴杰. 盱眙龙虾产业化研究[D]. 上海: 上海水产大学, 2007.
- [6] 唐建清, 夏爱军, 韩飞. 2010 年江苏克氏原螯虾养殖产业发展情况报告[J]. 水产养殖, 2011(2): 44-47.
- [7] 潘义, 朱瑞军, 吴学军. 宿迁市小龙虾养殖情况调查[J]. 渔业致富指南, 2007(20): 19-21.
- [8] 陈蓝荪, 李应森, 刘其根. 克氏原螯虾的生态养殖(六) - 中国的小龙虾经济(上)[J]. 水产科技情报, 2008, 35(6): 278-285.
- [9] TAUTZ D, RENZ M. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes [J]. Nucleic Acids Research, 1984, 12(10): 4127-4138.
- [10] 冯建彬, 吴春林, 丁怀宇, 等. 洪泽湖日本沼虾 9 个野生群体遗传多样性微卫星分析[J]. 中国水产科学, 2010, 17(2): 218-227.
- [11] 姜虎成, 冯建彬, 丁怀宇, 等. 淮河安徽段日本沼虾野生群体遗传结构的微卫星分析[J]. 上海海洋大学学报, 2012, 21(2): 167-175.
- [12] 马海涛, 常玉梅, 于冬梅, 等. 利用微卫星分子标记分析四个中华绒螯蟹群体的遗传多样性[J]. 动物学研究, 2007, 28(2): 126-133.
- [13] BARBARESI S, GHERARDI F, MENGONI A, et al. Genetics and invasion biology in fresh waters: a pilot study of *Procambarus clarkii* in Europe [M]. Biological invaders in inland waters: Profiles, distribution, and threats. Springer Netherlands, 2007: 381-400.
- [14] 王长忠, 李忠, 梁宏伟. 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.
- [15] 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.
- [16] 曹玲亮. 基于微卫星标记的克氏原螯虾遗传多样性研究[D]. 合肥: 安徽大学, 2010.
- [17] 黄羽. 鄱阳湖流域克氏原螯虾的资源状况及长江中下游克氏原螯虾遗传多样性研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2012.
- [18] 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.
- [19] GREEN M R, SAMBROOK J. Molecular cloning: a laboratory manual [M]. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012.
- [20] BASSAM B J, CAETANO-ANOLLES G, GRESSHOFF P M. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels [J]. Analytical Biochemistry, 1991, 196: 80-83.
- [21] BOTSTEIND, WHITERL, SKONICKM, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms [J]. The American Journal of Human Genetics, 1980, 32(3): 314-331.
- [22] 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: 47-50.
- [23] CORNUET J M, LUIKART G. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data [J]. Genetics, 1997, 144(4): 2001-2014.
- [24] FENG J B, LI J L. Twelve polymorphic microsatellites in Oriental river prawn, *Macrobrachium nipponense* [J]. Molecular Ecology Resources, 2008, 8(5): 986-988.
- [25] HARTL D L, CLARK A G. Principles of Population Genetics [M]. 3rd ed. Sunderland: Sinauer Associates, 1997.
- [26] NEI M, JAJIMA F, TATENO Y. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data [J]. Journal of Molecular Evolution, 1983, 19(2): 153-170.
- [27] 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): 2231-2234.
- [28] 唐鑫生. 克氏原螯虾[J]. 生物学通报, 2001, 36(9): 19-20.
- [29] 郭晓鸣, 朱松泉. 克氏原螯虾幼体发育的初步研究[J]. 动物学报: 英文版, 1997, 43(4): 372-381.
- [30] YUE G H, LI J, BAI Z, et al. Genetic diversity and population structure of the invasive alien red swamp crayfish [J]. Biological Invasions, 2010, 12(8): 2697-2706.
- [31] VILLANELLI F, GHERARDI F. Breeding in the crayfish, *Austropotamobius pallipes*: mating patterns, mate choice and intermale competition [J]. Freshwater Biology, 1998, 40(2): 305-315.
- [32] 龚世园, 李浪平, 吕建林, 等. 克氏原螯虾掘洞行为研究[J]. 淡水渔业, 2008, 37(6): 3-7.
- [33] 胡本龙, 曾庆飞, 赵小平, 等. 固城湖水环境质量变化趋势分析[J]. 水产养殖, 2010, 31(12): 1-3.

## Genetic diversity analysis of eight *Procambarus clarkii* stocks in Jiangsu Province based on microsatellites

XING Zhi-jun<sup>1</sup>, JIANG Hu-cheng<sup>1</sup>, LU Wei<sup>2</sup>, QIAN Zhao-jun<sup>1</sup>, YU Hong-wei<sup>2</sup>, LI Jia-le<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources, Ministry of Agriculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Jiangsu Xuyi Crayfish Eco-park Co. Ltd, Xuyi 211700, Jiangsu, China)

**Abstract:** Genetic diversity of eight *Procambarus clarkii* stocks in Jiangsu Province (Dapu, Pingwang, Qitang, Guantan, Xishunhe, Taiping, Guchen, Yanghetan) was investigated using 8 microsatellite DNA loci. The result showed that all the eight loci were highly or medium polymorphic. Tests of departures from Hardy-Weinberg equilibrium indicated all 64 loci in 8 stocks were significantly deviated from Hardy-Weinberg equilibrium after Bonferroni correction and most of them have significant heterozygosity deficiency. All of 8 stocks showed higher genetic diversity, and genetic diversity of the stocks in DP was the highest, and that of PW was the lowest.  $F_{ST}$  and AMOVA analysis across all stocks and loci indicated that there was medium level of divergence among 8 stock.  $F_{ST} = 0.126$  ( $0.05 < F_{ST} < 0.15$ ). The UPGMA clustering tree based on genetic distance ( $D_A$ ) demonstrated that the stocks of PW, QT and DP clustered into one group; TP, XS and GT converged into another group, and GC and YH constituted a branch singularly.

**Key words:** *Procambarus clarkii*; genetic diversity; Jiangsu Province; microsatellites