

文章编号 :1000 - 0615(2006)04 - 0463 - 06

中国东南沿海青蟹线粒体 COI 基因部分序列分析

马凌波^{1,2}, 张凤英¹, 乔振国¹, 何利军¹, 马春艳¹

- (1. 中国水产科学研究院东海水产研究所农业部海洋与河口渔业重点开放实验室, 上海 200090;
2. 中国水产科学研究院水产种质资源与养殖技术重点开放实验室, 广东 广州 510300)

摘要 :对我国东南沿海 5 个地区的 72 个青蟹个体的线粒体细胞色素氧化酶亚基 I(COI)部分序列序列进行了测定和分析。获得的 72 个细胞色素氧化酶亚基 I(COI)序列可分为 12 个单倍型,与 GenBank 中已知的 *Scylla paramamosain* COI 序列的相似性达到 98% 以上,与其它 3 种青蟹的差异为 7.36% ~ 15.54%。这些序列与 *S. paramamosain* 的遗传距离仅为 0.00783,但是与 *S. serrata*、*S. olivacea* 和 *S. tranquebarica* 的遗传距离却分别达到 0.11659、0.17812 和 0.08423。序列特征、遗传距离和系统进化等分析结果都表明本文研究的青蟹为 *S. paramamosain*。结果提示,在进行青蟹属相关研究应当仔细鉴别采集样本的种类。

关键词 :青蟹,细胞色素氧化酶亚基 I 种类鉴别

中图分类号 S 917 文献标识码 A

Sequence analysis of mitochondrial COI gene of *Scylla* spp. along coast of southeastern China

MA Ling-bo^{1,2}, ZHANG Feng-ying¹, QIAO Zhen-guo¹, HE Li-jun¹, Ma Chun-yan¹

- (1. Key and Open Laboratory of Marine and Estuarine Fisheries Certificated by the Ministry of Agriculture, East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090, China;
2. Key Laboratory of Fisheries Genetic Resources & Aquaculture, Chinese Academy of Fisheries Sciences, Guangzhou 510300, China)

Abstract : Culture of mud crab(genus *Scylla*) as precious seafood is growing rapidly in China recently. However, the taxonomy of mud crab in China is still in controversial. Mitochondrial cytochrome oxidase subunit I(COI) gene was used to identify species of genus *Scylla* resided along coast of southeastern China. A fragment of the COI gene was amplified and sequenced from 72 *Scylla* spp. individuals obtained from 5 regions along coast of southeastern China. 12 distinct haplotypes, which were identified among 72 COI sequences, were above 98% identical to the known *S. paramamosain* COI gene sequences, and showed 7.36% - 15.54% difference from other 3 species. The average genetic distance of COI sequences between these individuals and *S. paramamosain* is only 0.00783 and this does not significantly differ from the intraspecific distance, while between these individuals and *S. serrata*, *S. olivacea* and *S. tranquebarica* is 0.11659, 0.17812 and 0.08423 respectively. The NJ tree shows that all four species formed reciprocal monophyletic groups, with the *S. olivacea* located in the base, and *S. olivacea* closely related to *S. tranquebarica*. Four species of *Scylla* are delineated as four well supported groups, with average levels of interspecific sequence difference (- 12%) more than six times greater than that observed at the intraspecific level (- 2%) and 12 haplotypes identified in this study cluster closely with the known COI sequences from *S. paramamosain*. The results of sequence characterization, genetic distance and

收稿日期 2005-12-12

资助项目 :中国水产科学研究院水产种质资源与养殖技术重点开放实验室开放课题(2005A004);农业部结构调整重大技术研究专项(04 - 11 - 02B);农业部海洋与河口重点实验室开放课题(开 - 1 - 04 - 12)

作者简介 :马凌波(1972 -)男,福建连城人,博士,副研究员,主要从事水产生物技术研究。E-mail : malingbo@sina.com

通讯作者 :乔振国, Tel 021 - 65680295, E-mail : zehnguo-q@163.com

phylogenetic analysis suggest that all samples investigated should belong to *S. paramamosain* and *S. paramamosain* should be one of the most common species in China. Caution is called for species identification when studying *Scylla*.

Key words: *Scylla* spp.; cytochrome oxidase subunit I; species identification

青蟹属(*Scylla*)隶属于节肢动物门(Arthropoda)甲壳纲(Crustacea)十足目(Decapoda)梭子蟹科(Portunidae),分布于我国浙江、福建、台湾、广东、广西和海南沿岸水域,同时也分布于东南亚、澳大利亚、日本、印度、南非等海域。关于青蟹属的分类一直存在争议,Estampador^[1]认为该属应分成3个种1个亚种:*S. tranquebarica*、*S. oceanica*、*S. serrata*和*S. serrata* var. *paramamosain*。但Stephenson和Campbell^[2]认为受环境的影响所致,尚不足以将形态有差异的类群分立为独立的种,因此将青蟹属蟹类归并成*S. serrata*。Keenan等^[3,4]对红海以及整个印度洋至太平洋范围采集的标本进行了形态学、同工酶和线粒体COI和16S rRNA基因的测序分析,结果显示青蟹属包括4个不同种:*S. serrata*、*S. paramamosain*、*S. olivacea*、*S. tranquebarica*。此后尽管仍有争议,但青蟹属存在多个种的观点被更多的学者所接受^[5-10]。

在我国,青蟹一属一种的观点被长期沿用,至今只有锯缘青蟹一种中文学名,但是Keenan等^[3]提出青蟹属分4种的观点,并认为分布于我国厦门的青蟹可能和香港种同为*S. paramamosain*后,Li等^[11]和Zeng等^[12,13]将分布于我国厦门地区的青蟹用*S. paramamosain*表述,但未提供证据。王玉江等^[14]对3个来自中国青岛和2个越南的青蟹线粒体16S rRNA基因片段序列进行了测定,结果表明研究中所用的中国和越南青蟹都是*S. paramamosain*。但是由于没有对不同海区进行采样,以及样本量过少,还不能确定我国青蟹的种类组成和分布状况。

本文采用线粒体细胞色素氧化酶亚基I(COI)序列为标记,对分布于我国东南沿海5个地区的72个青蟹个体进行了序列测定,为确定分布和养殖于我国东南沿海地区的青蟹的分类地位提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

青蟹材料均为采集点近海区捕捞蟹苗养成

个体,分别采自海南文昌(5只)(编号:h1-5)和上海奉贤(7只)(编号:f1-7),广东汕头(20只)(编号:s1-20),广西北海(20只)(编号:g1-20)和浙江温州(20只)(编号:z1-20),共72个,活体运回实验室,取步足肌肉,-20℃保存备用。

1.2 基因组DNA的提取

取青蟹的步足肌肉约100 mg剪碎,分别放入1.5 mL的离心管中,加入600 μL抽提缓冲液(10 mmol·L⁻¹ Tris-Cl;100 mmol·L⁻¹ EDTA,pH 8.0)混匀后加入终浓度为1%的SDS和100 μg·mL⁻¹的蛋白酶K,55℃消化2~3 h,然后分别用等体积的酚:氯仿(1:1),氯仿:异戊醇(24:1)抽提,二倍体积无水乙醇沉淀,双蒸水溶解,于4℃保存备用。

1.3 mtDNA序列的扩增和测序

分别使用通用引物COI_f和COI_r^[15],以及青蟹属mtDNA COI特异性引物Mtd-10^[16]和C/N2769^[17]扩增青蟹COI序列,以鉴别mtDNA序列和核插入假基因序列^[18]。

PCR反应总体积为25 μL,其中包括10×PCR反应缓冲液2.5 μL(成分:100 mmol·L⁻¹ Tris-Cl,500 mmol·L⁻¹ KCl,15 mmol·L⁻¹ MgCl₂,1.3 mg·mL⁻¹ BSA,0.01% Gelatin,pH 8.4);基因组DNA(10 μg·mL⁻¹)2 μL;Taq酶(5 U·μL⁻¹)0.2 μL;dNTP(各2.5 mmol·L⁻¹)1 μL;引物(5 μmol·L⁻¹)1 μL;ddH₂O补足体积。样品在PTC-200扩增仪上进行扩增,94℃预变性5 min,94℃30 s,57℃1 s,72℃1 min,35个循环,72℃延伸10 min;4℃保存。扩增产物在1.5%琼脂糖凝胶上进行电泳分离,胶回收,连接至T-载体(Takana)并转化至大肠杆菌DH5α,筛选阳性克隆,由上海生工生物工程技术服务有限公司测序。

1.4 序列间的遗传距离估算及系统发育分析

本文测序得到72个COI序列中,有12个相互不同的序列,分别作为12个不同单倍型(GenBank登录号:z4,AY750926,f2,AY750927,f5,AY750928,z6,AY750929,s4,AY750930,h5,AY750931,s5,AY750932,s8,AY750933,f4,AY750934,g9,AY750935,f1,AY750936,

s1, AY750937)。本文涉及的 4 种青蟹已知 COI 序列来源为 GenBank :*S. serrata* (1A : AF097002, 1B : AF097003, 1D : AF097005, 2C : AF097018, 2D : AF097019, 2F : AF097014) *S. paramamosain* (Hongkong1 : AY373351, Hongkong2 : AY373352) *S. tranquebarica* (1 : AY373353, 2 : AY373354) 和 *S. olivacea* (AY373355, AY373356)。

对本文得到的 12 个单倍型和青蟹属 4 个种类的已知 COI 序列进行比较分析。线粒体 COI 序列间的遗传距离采用 Kimura 的双参数法^[19]进行估算。系统进化分析采用 Mega 3.0^[20]中的 Neighbor-joining (NJ) 法,以果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 的 COI 序列 (GenBank 登录号: AF200829) 作为外群,置信度估算采用 Kimura 的双参数法^[19],重复数 1000。

2 结果

本文获得 72 个线粒体 COI 序列,序列长 489 bp 编码 162 个氨基酸,共分为 12 个不同的单倍型 (GenBank 登录号: AY750926 - 750937)。

2.1 中国东南沿海青蟹 COI 基因的序列特征

获得的 12 个线粒体 COI 单倍型序列提交 GenBank,进行 Blast 比较,核苷酸序列与已知的 *S. paramamosain* COI 序列的相似性为 99%,只

存在少数几个位点的碱基替代。与 *S. serrata* COI 序列相比,序列相似性为 81%。序列多重比较 (图版) 显示,所获得的所有序列都与 *S. paramamosain* (香港群体) 相似,而与其它 3 种青蟹都存在较大差异。在可比较的 489 个碱基对中,本文所得序列与 *S. serrata* 差异为 9.98% ~ 10.84%,与 *S. paramamosain* (香港群体) 差异为 0.20% ~ 1.23%,与 *S. tranquebarica* 和 *S. olivacea* 的差异分别为 7.36% ~ 8.18% 和 14.93% ~ 15.54%。与锯缘青蟹 (*S. serrata*) 相比,本文所得序列与 *S. paramamosain* 一样有 45 个保守的特异性位点,其中 19 个与其它 3 种青蟹都不同,为 *S. paramamosain* 特有位点 (图版)。

2.2 青蟹属不同种 COI 序列间的遗传距离

对所获得的 12 个 COI 序列和已知青蟹属的 4 个种类的 COI 序列进行遗传距离分析。表 1 为采用 Kimura 双参数法进行估算的序列间的平均遗传距离,从表 1 中可以看出,中国东南沿海青蟹的 COI 序列与 *S. paramamosain* 遗传距离为 0.00836,与 *S. paramamosain* 种内的遗传距离 0.00835 以及本身的遗传距离 0.00544 没有显著差异,与其它 3 种青蟹的遗传距离则要大 10 倍以上。结果表明,中国沿海的青蟹与 *S. paramamosain* 同种,而与其它 3 种青蟹达到了种的差异。

表 1 种内和种间遗传距离的差异

Tab.1 Within and between species variation in genetic distance

	<i>S. serrata</i>	<i>S. paramamosain</i>	<i>Scylla</i> spp. (China)	<i>S. tranquebarica</i>	<i>S. olivacea</i>
<i>S. serrata</i>	0.01439				
<i>S. paramamosain</i>	0.11551	0.00835			
<i>Scylla</i> spp. (China)	0.11659	0.00836	0.00544		
<i>S. tranquebarica</i>	0.09552	0.08321	0.08423	0.00835	
<i>S. olivacea</i>	0.16705	0.17227	0.17812	0.14425	0.01685

注 遗传距离采用 Mega 3.0 软件中的 Kimura 2 参数法计算,对角线上黑体数值为种内个体间平均遗传距离,对角线下为种间遗传距离

Notes : Genetic distances were estimated using Kimura 's two-parameter (K2P) model. Values on the diagonal and indicated by bold text are average genetic distances within species and values under the diagonal are average genetic distances between species

2.3 青蟹属 COI 基因碱基替代方式及进化分析

所获得的 72 个 COI 序列可分为 12 个不同的单倍型 (haplotypes),共有 14 个可变位点。本文获得序列与 *S. serrata* 相比较,共有 45 个特异的保守位点,其中除 2 个在密码子第 1 位变化外,其余 43 个都是密码子第 3 位的变化,没有产

生编码氨基酸的变化。在所有已知的 4 种青蟹 COI 序列中,除 1 个 *S. paramamosain* 和 *S. tranquebarica* 序列各产生 1 个编码氨基酸的改变外,其余序列都没有编码氨基酸序列上的差异。种内 COI 序列比较,碱基替代方式主要为碱基替换,只在 *S. paramamosain*、*S. tranquebarica* 和 *S.*

olivacea 各发现 1 次碱基颠换/转换/颠换比值($R = si/sv$)大于 3。种间序列比较,碱基转换/颠换平均比值约为 2.9。采用 NJ 法重建 4 种青蟹的遗传关系,与 Keenan^[4]报道的 NJ 树结果一致,没有发现种间 mtDNA 渐渗现象(mtDNA introgression)。从构建的进化树(图 1)可看出本文所得的青蟹 COI 序列的 12 个单倍型与分布于香港的 *S. paramamosain* 聚为一枝,而其余 3 种青蟹分别聚为一枝,置信度都高达 100。种间序列平均差异(~12%)比种内序列平均差异(~2%)大 6 倍以上。结果同样证明,本文所调查的中国东南沿海青蟹应归类为 *S. paramamosian*。

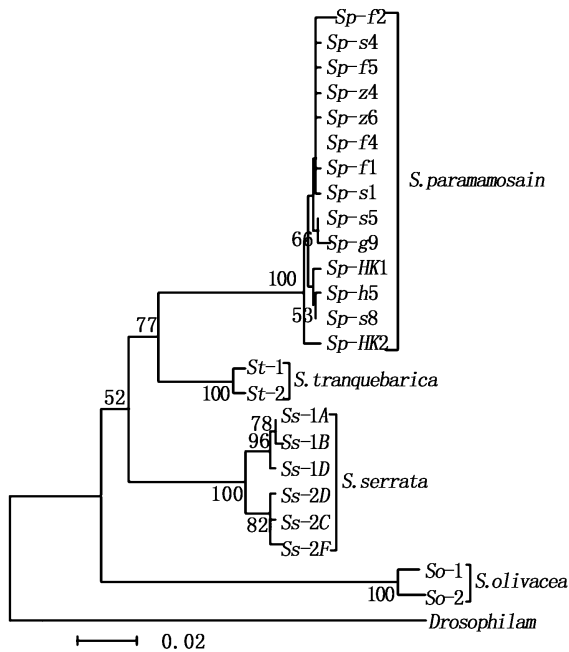


图 1 青蟹属 COI 序列 Neighbor-joining 进化树显示种间序列的相似性

Fig. 1 Neighbor-joining tree of *Scylla* COI sequences showing the similarity of those sequences within species

以果蝇 COI 序列为外群构建进化树,置信度小于 50% 未显示
Drosophila melanogaster COI sequence was used as the outgroup, and the bootstrap values less than 50% are not shown

3 讨论

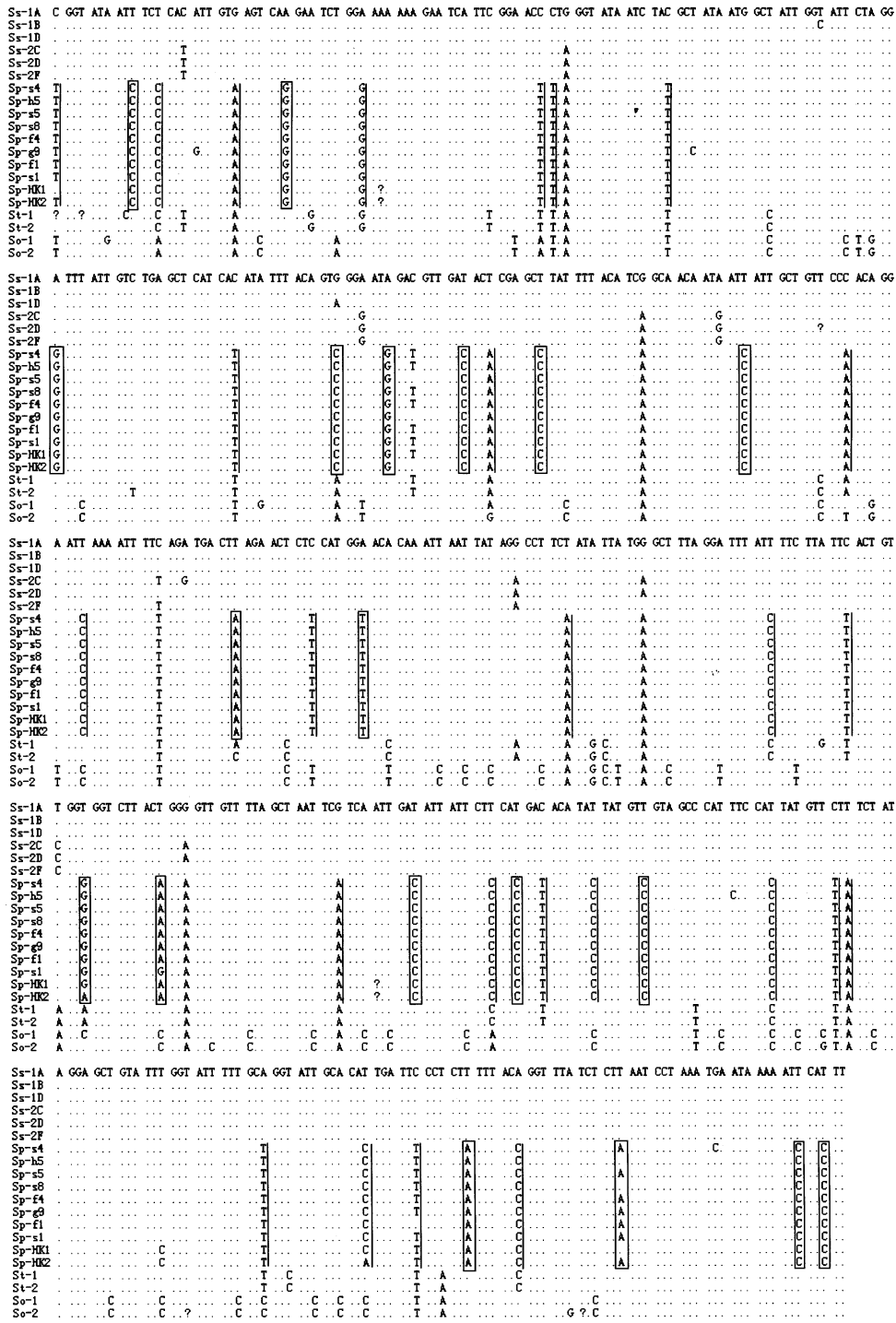
关于青蟹属的分类,根据形态、等位酶、核基因和线粒体 DNA 等不同方面的研究,存在 1 种

(*S. serrata*)^[2] 3 种(*S. serrata*、*S. oceanica*、*S. tranquebarica*)^[1] 和 4 种(*S. serrata*、*S. olivacea*、*S. tranquebarica*、*S. paramamosian*)^[3] 的争议,这些争议的焦点基本集中在形态特征的不确定上,在物种分类中,形态指标存在受环境影响大,不同物种由于相同的选择压力演化中会表现出相似的形态,或者相同物种由于不同的环境压力,会表现出不同的形态,这些特征会严重干扰物种的分类。而 DNA 序列提供了比表型特征更根本更敏锐的进化信息,因为表型特征都是 DNA 信息的表达,而且由于密码子的简并性,氨基酸水平的变异信息相对 DNA 序列变异水平要保守得多,因此,随着 PCR 技术和测序技术的发展, DNA 序列基础上的进化信息成为物种分类学中的重要指标和有力补充。

近年来,国内外学者通过分子标记方法对青蟹属的种类组成进行了鉴别,得出的结论基本都支持青蟹属分为多个不同种的观点^[3, 4, 7, 10, 14, 21, 22]。在本文调查的 5 个地区的随机取样的 72 个个体中,所有个体的 COI 序列都与 *S. paramamosain* 最为相似,而与其余 3 种有较大的特征性的差别。序列相似性程度、序列碱基遗传距离及系统进化分析等 3 个方面的结果都表明,本文所研究的青蟹个体与山东青岛^[14]、福建厦门^[3, 11-13] 一样应该都属于 *S. paramamosain*, 这一结果支持了 Keenan 的青蟹属分为 4 种的观点^[3], 并表明 *S. paramamosain* 广泛分布于我国山东、上海、浙江、福建、广东、广西和海南等沿海地区,也与青蟹属各种在西太平洋沿岸的分布状况吻合^[3, 4]。此外,施心展^[23] 和左荣升^[24] 利用形态学和 mtDNA 分析发现 4 种青蟹在我国台湾地区的分布,其中 *S. paramamosain* 占 67.7%, *S. serrata* 占 19.3%, *S. olivacea* 占 12.3%, *S. tranquebarica* 占 0.7%。由于样品数的限制,本文不排除锯缘青蟹(*S. serrata*)、*S. tranquebarica* 和 *S. olivacea* 等其它 3 种青蟹在我国大陆沿海地区存在,但对于分布范围和组成比例仍需要进行广泛的调查研究。由于 *S. paramamosain* 在我国沿海广泛分布,它们很可能在以往的研究中被误认为锯缘青蟹,因此,在针对青蟹属开展相关研究时,应当仔细鉴别采集样本的种类。

参考文献：

- [1] Estampador E P. Studies on *Scylla* (Crustacea : Portunidae) I. Revision of the genus [J]. Philippine Journal of Science , 1949 , 78 : 95 - 108.
- [2] Stephenson W , Campbell B. The Australian portunids (Crustacea : Portunidae) IV. Remaining genera [J]. Australian Journal of Marine and Freshwater Research , 1960 , 11 : 73 - 122.
- [3] Keenan C P , Davie P J F , Mann D L. A revision of the genus *Scylla* de Haan , 1883 (Crustacea : Decapoda : Brachyura : Portunidae) [J]. Raffles Bull Zool , 1998 , 46 : 217 - 245.
- [4] Keenan C P. The fourth species of *Scylla* [A]. In : Keenan C P , Blackshaw A. Mud crab aquaculture and biology [C]. ACAIR Proceedings No. 78. Watson Ferguson & Co , Australia , 1999. 48 - 58.
- [5] Imai H , Numachi K. Intra- and interspecific genetic variability and relationships among mud crabs , *Scylla* spp. (Decapoda : Portunidae) , demonstrated by RFLP analysis of mitochondrial DNA [J]. J Anim Genet , 2002 , 29 : 3 - 11.
- [6] Imai H , Obata Y , Sekiya S , et al. Mitochondrial DNA markers confirm successful stocking of mud crab juveniles (*Scylla paramamosain*) into a natural population [J]. Suisanzoshoku , 2002 , 50 : 149 - 156.
- [7] Imai H , Cheng J H , Hamasaki K , et al. Identification of four mud crab species (genus *Scylla*) using ITS - 1 and 16S rDNA markers [J]. Aquat Living Resour , 2004 , 17 : 31 - 34.
- [8] Klinbunga S , Boonyapakdee A , Pratoomchat B. Genetic diversity and species-diagnostic markers of mud crabs (genus *Scylla*) in eastern Thailand determined by RAPD analysis [J]. Mar Biotechnol , 2000 , 2 : 180 - 187.
- [9] Gopurenko D , Hughes J M , Keenan C P. Mitochondrial DNA evidence for rapid colonisation of the Indo-West Pacific by the mud crab *Scylla serrata* [J]. Mar Biol , 1999 , 134 : 227 - 233.
- [10] Fuseya R , Watanabe S. Genetic variability in the mud crab genus *Scylla* (Decapoda : Portunidae) [J]. Fisheries Science , 1996 , 62 (5) : 705 - 709.
- [11] Li S , Zeng C , Tang H , et al. Investigations into the reproductive and larval culture biology of the mud crab , *Scylla paramamosain* : a research overview [A]. In : Keenan C P , Blackshaw A. Mud crab aquaculture and biology [C]. ACAIR Proceedings No. 78. Watson Ferguson & Co , Australia , 1999. 121 - 124.
- [12] Zeng C , Li S. Effects of density and different combinations of diets on survival , development , and chemical composition of larvae of the mud crab , *Scylla paramamosain* [A]. In : Keenan C P , Blackshaw A ed. Mud crab aquaculture and biology [C]. ACAIR Proceedings No. 78. Watson Ferguson & Co , Australia. 1999. 159 - 166.
- [13] Zeng C , Li S , Zeng H. Occurrence of additional Zoea-VI larvae in the mud crab , *Scylla paramamosain* (Estampador) , reared in the laboratory [J]. Hydrobiologia , 2004 , 529 : 49 - 58.
- [14] 王玉江 , 高天翔 , 韩志强 , 等. 中国和越南青蟹线粒体 16S rRNA 基因序列分析 [J]. 中国海洋大学学报 , 2005 , 35 (4) : 554 - 558.
- [15] Palumbi S , Martin A , Romano S , et al. The simple fool ' s guide to PCR version 2. 0 [M]. Honolulu : Department of Zoology and Kewalo Marine Laboratory , University of Hawaii , 1991.
- [16] Roehrdanz R L. An improved primer for PCR amplification of mitochondrial amplification in a variety of insect species [J]. Insect Mol Biol , 1993 , 2 : 89 - 91.
- [17] Gopurenko D , Hughes J M. Regional patterns of genetic structure among Australian populations of the mud crab *Scylla serrata* (Crustacea : Decapoda) : evidence from mitochondrial DNA [J]. Mar Freshw Res , 2002 , 53 : 849 - 857.
- [18] 张凤英 , 马凌波 , 乔振国 , 等. 青蟹线粒体 COI 假基因的分离和特征分析 [J]. 遗传 , 2006 , 28 (1) : 43 - 49.
- [19] Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences [J]. J Mol Evol , 1980 , 16 : 111 - 120.
- [20] Kumar S , Tamura K , Nei M. MEGA3 : Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment [J]. Briefings in Bioinformatics , 2004 , 5 : 150 - 163.
- [21] 杉本昌彦. アイソザイムを指標としたノコギリガザミ属の群解析 [R]. 高知县水产试验场报告书 , 1990. 18 - 22.
- [22] 高天翔 , 王玉江 , 韩志强 , 等. 三种青蟹线粒体 12S rRNA 基因序列分析 [J]. 水产学报 , 2005 , 29 (3) : 313 - 317.
- [23] 施心展. 四种青蟹 (*Scylla* spp.) 在外部形态上及核糖体 DNA 上之差异 [D]. 国立中山大学海洋生物研究所硕士学位论文 (台湾) , 1999.
- [24] 左荣升. 四种青蟹大眼幼体在外部形态及族群动态上之差异 [D]. 国立中山大学海洋生物研究所硕士学位论文 (台湾) , 2002.



图版 四种青蟹 COI 基因核苷酸序列比对

Plate Aligned nucleotide sequences of COI gene from four species of *Scylla*

与锯缘青蟹(单倍型 1A)相应位点一致的核苷酸以点表示,只在 *S. paramamosain* 种内高度保守的核苷酸加框表示,其余与 *S. serrata* 不同但高度保守的核苷酸加以右划线表示

Dots represent nucleotides that are identical to the ones in the corresponding positions in the COI sequence of *S. serrata* (haplotype 1A), nucleotides only highly conserved in *S. paramamosain* are labeled with rectangles, and other high conserved nucleotides differed from *S. serrata* are labeled with right-lines