

文章编号:1000 - 0615(2005)03 - 0313 - 05

3 种青蟹线粒体 12S rRNA 基因序列分析

高天翔¹, 王玉江¹, 刘进贤¹, 渡边精一², 伏屋玲子²

(1. 中国海洋大学海水养殖教育部重点实验室, 山东 青岛 266003;

2. 东京海洋大学水生生物系, 日本 东京 108 - 8477)

摘要:对采自泰国、马达加斯加和日本各地的青蟹属的 3 种青蟹 *Scylla serrata* (Forskål)、*S. oceanica* (Dana) 和 *S. tranquebarica* (Fabricius) 的线粒体 12S rRNA 基因片段序列进行了测定, 分析研究了其种间遗传差异及系统发育关系。研究结果显示: *S. serrata*、*S. oceanica* 及 *S. tranquebarica* 在 12S rRNA 基因片段上存在长度差异, 3 种青蟹的序列长度分别为 422 bp、426 bp、425 bp; 种内个体间无序列差异或差异极小, 种间序列差异远大于种内差异。以日本蛸和底栖短桨蟹为外群, 采用距离法和最大简约法重新构建了 3 种青蟹的分子系统树, 得到的三个明显的分枝分别对应于上述 3 种青蟹, *S. oceanica* 与 *S. tranquebarica* 两种间的亲缘关系较近。研究结果支持 3 种青蟹为不同物种的观点, 建议对其进行分别的渔业管理。

关键词:青蟹属; 线粒体 DNA; 12S rRNA 基因; 遗传变异; 系统发育

中图分类号: S917 **文献标识码:** A

Sequence analysis of mitochondrial 12S rRNA gene in three species of *Scylla*

GAO Tian-xiang¹, WANG Yu-jiang¹, LIU Jin-xian¹, WATANABE Seiichi², FUSEYA Reiko²

(1. The Key Laboratory of Mariculture Certificated by Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

2. Department of Aquatic Biosciences, Tokyo University of Marine Science and Technology, Tokyo 108 - 8477, Japan)

Abstract: This paper deals with the sequence analysis of mitochondrial 12S rRNA gene fragment and phylogenetic relationship of three mud crabs, *Scylla serrata* (Forskål), *S. oceanica* (Dana) and *S. tranquebarica* (Fabricius) collected from Japan, Thailand and Madagascar. The result indicated that there was length variation among three mud crabs, which was 422bp, 426 bp and 425 bp respectively. Genetic distance inter-species was greater than that intra-species. Trees constructed by distance method and maximum parsimony method using *Charybdis japonica* and *Thalamita prymna* as the outgroup indicated that there were three distinct clades corresponding to *S. serrata*, *S. oceanica* and *S. tranquebarica* respectively. It suggested that the three mud crabs should be recognized as valid species and managed as different fishery management unit.

Key words: *Scylla*; 12S rRNA gene; genetic variation; phylogeny

青蟹隶属节肢动物门 (Arthropoda)、甲壳纲 (Crustacea)、十足目 (Decapoda)、梭子蟹科 (Portunidae)、青蟹属 (*Scylla*), 广泛分布于太平洋、印度洋的温带、亚热带和热带海区的红树林地区及河口区^[1,2]。

最初, 青蟹属蟹类被认为只有单一物种, 但分类学家们所用的学名不同。1949 年, Estampador^[3] 通过研究将该属蟹类归并为 3 种 1 亚种, 即 *S.*

serrata (Forskål), *S. oceanica* (Dana), *S. tranquebarica* (Fabricius) 和 *S. serrata* var. *paramamosain*。许多研究均表明青蟹属蟹类在分类学上应该不止存在 1 个种^[4-13], 但也有学者认为青蟹应为 1 个种^[14,16], 该属蟹类的分类尚存疑问。动物线粒体 DNA (mtDNA) 具有分子量小、母性遗传及比核基因 DNA 进化速度快等特点, 已被广泛应用于进化生物学研究中^[17,18]。有关青蟹 mtDNA 序列研

收稿日期: 2004-03-19

资助项目: 日本学术振兴会未来开拓学术研究课题 (97L00902); 国家重点基础研究发展规划项目 (G19990437)

作者简介: 高天翔 (1962 -), 男, 辽宁辽阳人, 教授, 博士, 主要从事渔业生物学和种群遗传学研究。E-mail: gaozhang@ouc.edu.cn

究,仅见国外学者对 COI 和 16S rRNA 基因进行了测序分析^[6-8]。12S rRNA 基因序列已被用于一些虾蟹类的初步研究^[19,20],但国内外尚未见有关青蟹 12S rRNA 基因序列的研究报道。

本研究采用线粒体 12S rRNA 基因作为分子标记,对采自泰国、马达加斯加和日本各地的 3 种青蟹进行了序列测定及分析,以阐明 3 种青蟹的遗传差异和系统进化关系,为确定青蟹的分类地位、并为青蟹资源的合理利用与保护提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用 3 种野生青蟹采集于 1994 年 4 月至 1995 年 9 月,按照 Estampador^[3]提出的分类标准对样品进行了形态分类,样品分别采自泰国 Surat Thani(用 S-Surat Thani 表示,S 代表 *S. serrata*,下同)、马达加斯加(用 O-Madagascar 表示,O 代表 *S. oceanica*,下同)和日本的高知(用 O-Kochi, T-Kochi 表示,T 代表 *S. tranquebarica*,下同)、静冈滨名湖 L. Hamana (O-L. Hamana, S-L. Hamana) 和冲绳 (O-Okinawa, S-Okinawa); 本研究中 Estampador 分类系统中的 3 个种 *S. serrata*, *S. oceanica*, *S. tranquebarica* 分别对应于 Keenan 分类系统中 *S. olivacea*、*S. serrata*、*S. paramamosain*, 外群采用日本螯 *Charybdis japonica* (文中用 *C. japonica* 表示,下同) 和底栖短桨蟹 *Thalamita prymna* (文中用 *T. prymna* 表示,下同)^[21]。活体或冷冻样品运到东京水产大学水生生物系生物学实验室后, -20℃ 以下保存备用。

1.2 实验方法

基因组 DNA 的提取 取约 100 mg 的青蟹附肢肌肉,使用试剂盒 (Pharmacia Biotech) 提取基因组 DNA。将乙醇沉淀后 DNA 溶解于 50 μL 灭菌蒸馏水,4℃ 存放。

PCR 扩增 12S rRNA 目的基因片段 PCR 扩增的两个引物分别为: 12S rRNA-F 5' CTAGATRCACCTTTCCAGTACA-3' 和 12S rRNA-R 5' CYAGGATTAGATACCCTRTT-3'^[17]。扩增片段对应于果蝇 *Drosophila yakuba* 线粒体基因组全序列的 14 180 ~ 14 589 bp 片段^[22]。在 TP 3000 热循环仪 (Takara) 上进行 PCR 反应: 94℃ 预变性 6 min 后进行 35 个循环,每个循环包括 94℃ 45 s,

45℃ 45 s, 72℃ 45 s; 最后 72℃ 延伸 7 min。PCR 反应总体积为 25 μL, 其中: 上下游引物 (20 ~ 50 μmol μL⁻¹) 各 1 μL, dNTPs (Takara) 2 μL, 10 × Ex Taq (Takara) 2.5 μL, Ex Taq 酶 (Takara) 1.25 U, 约 1 μg 基因组 DNA 1 μL, 最后补足灭菌双蒸水。所有反应均设立阴性对照以检查是否有 DNA 污染。用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增片段大小, 溴化乙锭染色, 紫外透射仪下检测并照相记录。

连接反应 用 2% 琼脂糖凝胶纯化回收 PCR 扩增产物。连接反应在 16℃ 下过夜进行。反应总量为 8 μL, 其中: pGEM-T 载体 (Promega) 0.5 μL, 连接试剂盒 (Takara) 中 I 液 4 μL, 回收 DNA 3.5 μL。

转化反应 参照文献 [2] 方法进行转化反应, 用试剂盒 (Pharmacia) 回收提纯质粒 DNA 后, EcoRI 酶切, 检验 12S rRNA 基因的有无。

序列测定 利用 Thermo sequence fluorescent labeled primer cycle sequencing 试剂盒 (Amersham) 对回收质粒 DNA 进行标记反应, 在 ALFexpress DNA 序列仪上进行青蟹 12S rRNA 基因片段的正反向测序。

数据分析 用 DNASTAR 和 MEGA 2.1 软件进行所测序列的编辑、排序、系统发育和遗传学分析^[24]。采用 Kimura 双参数模型计算遗传距离, 以日本螯和底栖短桨蟹作为复合外群, 分别用 NJ 法和 UPGMA 法重建系统树, 用 Max-mini Branch & bound 法搜索最大简约树, 对所得的系统树进行自展法检验 (1 000 次重复)。

计算 3 种青蟹间的 *p* 距离来比较序列间的分歧程度^[25], 根据直翅目昆虫 *Laupala* spp. 12S rRNA 和 16S rRNA 序列推算的 2%/Myr 的序列分歧速率估算 3 种青蟹的分歧年代^[26]。

$$p = n_d / n$$

其中, n_d 和 n 分别为所检测的两序列间不同核苷酸数和配对核苷酸总数。

2 结果

2.1 3 种青蟹 12S rRNA 基因序列差异

对 3 种青蟹 *S. serrata*、*S. oceanica* 和 *S. tranquebarica* 线粒体 12S rRNA 基因片段进行 PCR 扩增和序列测定, 3 种青蟹存在序列差异, 其序列长度分别为 422 bp、426 bp、425 bp; 其 A、T、G、C

含量分别为 35.31%、36.18%、11.14%、17.38%；35.39%、38.03%、10.86%、15.73%；36.00%、38.12%、10.12%、15.76%；3 种青蟹 A + T 含量的平均值相近,在 71.49% ~ 74.12% 之间,明显高于 G + C 含量。所有序列提交到 GenBank, 登录号为 AY647177 - AY647184 (由于 GenBank 中采用的是 Keenan 的分类系统,因此序列登录时采用了 Keenan 分类系统中的种名)。

排除 11 个存在插入/缺失的位点,3 种青蟹序列间共有 30 个变异位点,定义了 31 个核苷酸

替代。其中转换 22 个,颠换 9 个。*S. oceanica* 与 *S. serrata*、*S. serrata* 与 *S. tranquebarica*、*S. oceanica* 与 *S. tranquebarica* 间核苷酸替换数、插入/缺失数及颠换数分别为 25、10、9；28、7、10；15、3、1。青蟹种内个体 12S rRNA 基因片段序列长度相同,无核苷酸差异或差异极小,*S. oceanica* 4 个群体出现了两种单倍型,冲绳的 *S. oceanica* 与其他群体间在 132 位点有一个 A/G 转换;*S. serrata* 3 群体间出现了 3 种单倍型,在 128 位点有一 C/G 颠换,427 位点有一 T/G 颠换(图 1)。

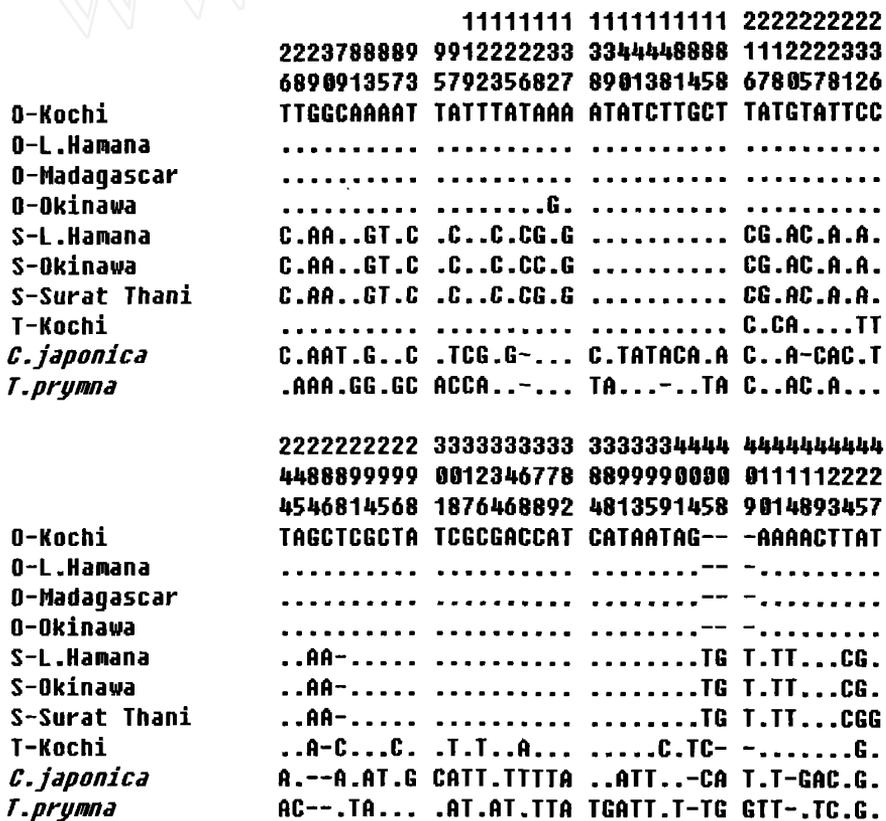


图 1 3 种青蟹及外群 12S rRNA 基因片段变异位点

Fig. 1 The variation sites of 12S rRNA gene fragment among three *Scylla* species and two outgroup species

代表该处与参考序列相同, - 代表缺失, 数字代表发生变异的位点
 represents nucleotides here were identical with the reference sequence,
 - represents indels, numbers were names of the variation sites

2.2 青蟹属蟹类种间遗传距离与分子进化树

利用 Kimura 双参数法计算了 3 种青蟹属蟹类种内和种间的遗传距离,*S. oceanica* 群体间遗传距离平均值为 0.0013, 与 *S. serrata*、*S.*

tranquebarica 间遗传距离的平均值分别为 0.0474、0.0284; *S. serrata* 种群间遗传距离平均值为 0.0033, 与 *S. tranquebarica* 间遗传距离的平均值为 0.0576。由此可见, *S. oceanica* 与 *S.*

tranquebarica 间的遗传距离小于它与 *S. serrata* 间的遗传距离。

NJ、UPGMA、MP 法构建的分子系统树基本一致(图 2), *S. oceanica* 与 *S. tranquebarica* 首先聚到一起, 然后才与 *S. serrata* 聚为一枝, 表明 *S. oceanica* 与 *S. tranquebarica* 间亲缘关系较近, 而与 *S. serrata* 亲缘关系较远。

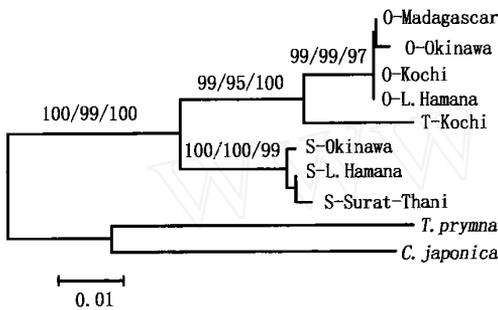


图 2 基于 12S rRNA 基因木村双参数距离模型构建的邻接树(NJ tree)

Fig. 2 Neighbor-joining (NJ) tree constructed, based on K 2p distances for 12S rRNA gene

数字表示 1000 次自展重复抽样检验的自展置信值, 使用算术平均的不加权的组对法(UPGMA)构建的系统树和简约法构建的 MP 树的自展置信值也在图中给出, 顺序是(NJ/UPGMA/MP) Bootstrap values (1000 replications) for UPGMA and maximum parsimony (MP) analysis are also pictured(NJ/UPGMA/MP)

2.3 3 种青蟹属蟹类种间的分化时间

3 种青蟹属蟹类种间的 p 距离分别为 *S. oceanica* 与 *S. serrata* 0.0597; *S. serrata* 与 *S. tranquebarica* 0.0667; *S. oceanica* 与 *S. tranquebarica* 0.0354。根据 3 种青蟹间的 p 距离和 Brower 计算的分歧速率, 推算 3 种青蟹种间的分歧时间 *S. oceanica* 与 *S. serrata* 约 300 万年; *S. serrata* 与 *S. tranquebarica* 约 330 万年; *S. oceanica* 与 *S. tranquebarica* 约 180 万年。

3 讨论

实验结果表明, 青蟹属蟹类与其他蟹类间具有很高的同源性。*S. tranquebarica*、*S. oceanica* 间的亲缘关系最近, 推算的分歧时间约为 180 万年; *S. serrata* 与 *S. tranquebarica* 的亲缘关系最远, 推算的分歧时间约为 330 万年。该属蟹类的新物种形成可能与上新世(Pliocene)和更新世(Pleistocene)的地质运动和冰期活动有关^[27]。

最初, 青蟹属蟹类被认为只有单一物种, 但分类学家们所用的学名不同。1949 年, Estampador^[3]

通过对前人记录的探讨, 并结合菲律宾产青蟹甲壳、螯足等部位各部分花纹、额齿的形状、刚毛以及栖息地点等认为该属应分成 3 种及 1 亚种, 即 *S. tranquebarica*、*S. oceanica*、*S. serrata* 和 *S. serrata* var. *paramamosain*。此后, Serene^[4]也通过对越南产标本额齿及蟹螯腕节外缘棘的状态、前侧缘等形状的观察研究, 得出了与 Estampador 同样的结论。但 Stephenson 和 Campbell^[14]、Stephenson^[15]和 Holthius^[16]认为 Estampador、Serene 观察到的基于额齿、螯足腕节外缘棘的形态差异是磨擦损耗结果, 其体色、栖息地和习性等方面的差异则是受环境的影响所致, 尚不足以将形态有差异类群分立为独立的种, 因此将青蟹属蟹类归并成 *S. serrata* 一种^[14-16]。Ong^[28]对马来西亚产青蟹幼体进行观察, 虽然他认同 Estampador 提出的 4 种青蟹, 但却以 *S. serrata* 进行了调查研究。Kathirvel 和 Srinivasagam^[9]通过研究认为 *S. serrata* 是 *S. tranquebarica* 的同物异名; 另一些学者认为在印度水域至少存在 2 种青蟹^[9-11]。大城^[12]根据 Estampador 研究报道, 认为日本存在 *S. tranquebarica*、*S. oceanica*、*S. serrata* 3 个种, 并给出了日语学名。目前, 日本栽培渔业协会将 *S. serrata* 和 *S. oceanica* 分开进行苗种生产、放流、统计管理等。本研究的结果支持 Estampador 基于形态学研究的结果。

近年来, 国外学者还对该属蟹类的分类和群体结构进行了遗传学探讨。杉本^[13]对日本国内产的 *S. tranquebarica*、*S. oceanica* 和国外产 *S. serrata* 进行的同工酶分析结果表明, 3 种间在 AAT、EST-1、MPI 基因位点上存在基因置换, *S. tranquebarica* 与 *S. oceanica* 间遗传距离为 0.009, 而 *S. serrata* 与其他两者间遗传距离为 0.200, 并报告说该种可能是独立的一个种。Sugama 和 Hutapea^[29]通过对 *S. oceanica*、*S. tranquebarica*、*S. paramamosain* 的同工酶分析表明, *S. oceanica* 与 *S. tranquebarica* 遗传距离最小。Fuseya 和 Watanabe^[5]对日本、泰国、印度尼西亚和马达加斯加的青蟹 *S. oceanica*、*S. tranquebarica*、*S. serrata* 进行了同工酶研究, 结果显示三者间在 EST、LAP-2 和 SOD 基因位点存在基因置换, 种间遗传距离远大于种内遗传距离, *S. serrata* 与 *S. tranquebarica* 遗传距离最小。Keenan 等^[6,7]从红海(*S. serrata* Forsk)模式标本的初产地)和整个印度洋、太平洋范围内采集了标本, 进行了形态学、同工酶和线粒体 COI 和 16S rRNA 基因的测序分析, 在此基础上, 对青蟹属蟹类的分类进行了重

新探讨,研究结果认为青蟹应分为 4 个不同的种:

S. serrata, *S. paramamosain*, *S. olivacea*, *S. tranquebarica*,但这与 Kathirvel 和 Srinivasagam^[9]的 *S. oceanica* 是 *S. tranquebarica* 的同物异名结论相矛盾。Klinbunga 等^[30]采用 RAPD 技术研究了在泰国同域分布的 3 种青蟹:*S. serrata*, *S. oceanica* 及 *S. tranquebarica*,其研究结果表明这 3 种青蟹间存在遗传差异,应该属于 3 个不同的种。Gopurenko 等^[8]研究了 *S. serrata* 整个分布范围内的样本,分析了线粒体单倍型的系统地理分布,研究结果发现分布在澳大利亚北部的 *S. serrata* 跟其他地区分布的该种青蟹在 549 bp 的 COI 序列上有大约 2% 的差异,推测分布在澳大利亚北部的 *S. serrata* 是该属的一新种。

综上所述,青蟹属蟹类的分类还存在一些疑问和混乱。本研究对 12S rRNA 基因序列分析结果与 Klinbunga 等^[30]、Fuseya 和 Watanabe^[5]的研究结果一致,从核内与核外两个不同的角度支持了 *S. serrata*, *S. oceanica* 及 *S. tranquebarica* 应该是 3 个独立物种的观点。因此,从保护生物学的角度出发,这 3 种青蟹应该作为不同的管理单位 (management units)、根据其各自的生物学特性进行分别的渔业管理^[31]。

参考文献:

- [1] 戴爱云,杨思谅,宋玉枝,等. 中国海洋蟹类[M]. 北京:海洋出版社,1986.190-191.
- [2] Macnae W. General account of the fauna and flora of mangrove swamps and forests in the Indo-West-Pacific region[J]. Adv Mar Biol, 1968, 6:74-270.
- [3] Estampador E P. Studies on *Scylla* (Crustacea: Portunidae), I. Revision of the genus[J]. Philippine Journal of Science, 1949, 78:95-108.
- [4] Serene R. Les especes du genre *Scylla* a Nhatrang (Vietnam) [R]. Proceeding of the Indo-Pacific Fishery Commission, 1952, 3:133-137.
- [5] Fuseya R, Watanabe S. Genetic variability in the mud crab genus *Scylla* (Decapoda: Portunidae) [J]. Fisheries Science, 1996, 62(5):705-709.
- [6] Keenan C P, Davies P J, Mann D L. A revision of the genus *Scylla* de Haan, 1833 (Crustacea: Decapoda: Brachyura: Portunidae) [J]. Raffles Bull Zool, 1998, 46:217-245.
- [7] Keenan C P. The fourth species of *Scylla* [R]. ACIAR Proceedings, 1999, 78:48-58.
- [8] Gopurenko D, Hughes J M, Keenan C P. Mitochondrial DNA evidence for rapid colonization of the Indo-West Pacific by the mud crab *Scylla serrata* [J]. Marine Biology, 1999, 134:227-233.
- [9] Kathirvel M, Srinivasagam S. Taxonomy of the mud crab, *Scylla serrata* (Forskål), from India. The mud crab [R]. A report on the seminar convened in Surat Thani, Thailand. Angell C A, eds, Bay of Bengal Programme, Madras, India, 1992, 211-221.
- [10] Joel D R, Raj P J S. Taxonomic remarks on two species of the genus *Scylla* de Haan (Portunidae: Crustacea) from Pulicat Lake [J]. Indian Journal of Fisheries, 1983, 30:13-26.
- [11] Radhakrishnan C K, Samuel C T. Report on the occurrence of one subspecies of *Scylla serrata* (Forskål) in Cochin Backwaters [J]. Fisheries Technology, 1982, 19:5-7.
- [12] 大城信弘. ノコギリガザミ類. サンゴ礁域の増養殖. 诸喜田茂充编[M]. 东京:绿书房,1988,198-209.
- [13] 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.
- [14] Stephenson W, Campbell B. The Australian portunids (Crustacea: Portunidae). Remaining genera [J]. Australian Journal of Marine and Freshwater Research, 1960, 11:73-122.
- [15] Stephenson W. An annotated checklist and key to the Indo-West-Pacific swimming crabs (Crustacea: Decapoda: Portunidae) [J]. Royal Society of New Zealand, Bulletin, 1972, 10:1-64.
- [16] Holthius L B. A collection of decapod Crustacea from Sumba, lesser Sunda Islands, Indonesia [J]. Zoologische Verhandlungen Uigegeven Door Het Rijksmuseum Van Natuurlijks Historiete Leiden, 1978, 162.
- [17] Brown W M. Evolution of animal mitochondrial DNAs [M]. In Nei M, Koehned R K eds. Evolution of genes and proteins [M]. Sinauer: Sunderland MA, 1983.
- [18] Lu G, Li S. Advances in the study and application of fish mitochondrial DNA polymorphism [J]. Journal of Fisheries of China, 1998, 3:94-103.
- [19] 高天翔,张秀梅,渡边精一. 中华绒螯蟹与日本绒螯蟹线粒体 DNA 12S rRNA 序列的比较 [J]. 水产学报,2000,24(5):412-416.
- [20] 高天翔,张秀梅,张军生. 齿突斜纹蟹线粒体 DNA 中 12S rRNA 基因序列研究 [J]. 大连水产学院学报,2000,2:98-102.
- [21] 高天翔,张秀梅,渡边精一,等. 日本虫蛸 *Charybdis japonica* 和底栖短桨蟹 *Thalamita prymna* 线粒体 DNA 12S rRNA 基因序列的初步研究 [J]. 中国海洋大学学报,2004,1:43-47.
- [22] Clary D O, Wolstenholme D R. The mitochondrial DNA molecule of *Drosophila yakuba*: nucleotide sequence, gene organization, and genetic code [J]. J Molec Evol, 1985, 22:252-271.
- [23] 中山光树,西方敬人. バイオ実験 イラストレイテッド 遗传子解析の基礎 [M]. 东京:秀润社,1995.
- [24] Kumar S, Tamura K, Jakbosen I B, et al. MEGA 2: molecular evolutionary genetics analysis software [J]. Bioinformatics, 2001, 17:1244-1245.
- [25] 根井正利,苏德海尔·库马. 分子进化与系统发育 [M]. 北京:高等教育出版社,2002.
- [26] Brower A V. Rapid morphological radiation and convergence among races of the butterfly *Heliconius erato* inferred from patterns of mitochondrial DNA evolution [J]. Proc Natn Acad Sci, USA, 1994, 91:6491-6495.
- [27] McManus J W. Marine speciation, tectonics and sea-level changes in southeast Asia [R]. Proc 5th int coral reef congr, 1985, 4:133-138.
- [28] Ong K S. The early developmental stages of *Scylla serrata* Forskal (Crustacea Portunidae) [R]. Proceeding of the Indo-Pacific Fishery Commission, 1964, 11:135-146.
- [29] Sugama K, Hutapea J H. Genetic characterization in the mud crab *Scylla* (Brachyura: Portunidae) [R]. ACIAR Proceedings, 1999, 78:43-47.
- [30] 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.
- [31] Carvalho G R, Hauser L. Molecular genetics and the stock concept in fisheries [J]. Rev Fish Biol Fisheries, 1994, 4:326-350.