

台灣產 8 種梭子蟹類粒線體 DNA 中 COI 及 16S rRNA 之類緣關係研究

梁宏彥·蕭聖代*

行政院農業委員會水產試驗所海洋漁業組

摘 要

梭子蟹類是台灣重要的經濟水產資源之一，其資源管理往往因過度捕撈產生許多問題。然而物種基因序列的建立是進行種類的鑑定及親緣比對的重要工具，有了這些基礎方能進行完善的資源管理。因此，本研究利用粒線體 DNA 中 16S rRNA 和 COI 兩段基因之核苷酸序列資料，作為台灣產經濟梭子蟹類物種鑑定時分子遺傳標誌 (Molecular marker)，並了解其種內和種間的遺傳差異及探討其分類地位。本研究類緣分析結果發現，梭子蟹科依其不同屬可分為四群，第一群為蟬屬 (*Charybdis*) 的銹斑蟬 (*C. feriatus*) 和顆粒蟬 (*C. granulata*)，第二群為梭子蟹屬 (*Portunus*) 的遠海梭子蟹 (*P. pelagicus*) 和紅星梭子蟹 (*P. sanguinolentus*)，第三群為青蟹屬 (*Scylla*) 的欖綠青蟹 (*S. olivacea*)、鋸緣青蟹 (*S. serrata*) 和擬深穴青蟹 (*S. paramamosain*)，第四群則是圓趾蟹屬 (*Ovalipes*) 的細點圓趾蟹 (*O. punctatus*)。由親緣關係樹狀圖可以發現蟬屬和梭子蟹屬關係較為接近與青蟹屬關係較遠。

關鍵詞：梭子蟹類、粒線體 DNA、COI、16S rRNA、類緣分析

前 言

蟹類是台灣高經濟價值的大宗水產資源，梭子蟹科 (Portunidae) 更是台灣沿海重要的漁業資源，其中如遠海梭子蟹 (*Portunus pelagicus*)、紅星梭子蟹 (*P. sanguinolentus*)、銹斑蟬 (*Charybdis granulata*)、鋸緣青蟹 (*Scylla serrata*) 等都是深受消費者喜愛的大型食用經濟蟹類。梭子蟹類主要棲息於近岸淺海、水深 10~50 m、沙泥底質的海域，可以單船、雙船拖網、中小型拖網及刺網等方法捕獲。2006 年總產量達 5,374 mt，產值高達新台幣 70 億 6 仟萬元。

梭子蟹科的種類多達 200 多種，是物種非常豐富的一科。此科蟹類最主要的特徵為頭胸甲寬大於長，且最後一對步腳特化成扁平狀，具划水功能。梭子蟹科中的梭子蟹屬 (*Portunus*)、蟬屬

(*Charybdis*)、青蟹屬 (*Scylla*) 和圓趾蟹屬 (*Ovalipes*) 皆是台灣重要的經濟蟹類。梭子蟹屬特徵為頭胸甲兩側較為尖銳，且前側緣的齒大多為 7 個以上，第二觸角基節板不特別突出，位於眼窩內角。蟬屬頭胸甲為近六邊形，前半部具橫向隆脊，前側緣有 6~7 齒，前額不含眼窩上齒分有六齒，螯腳較步腳長或相等，第四步腳指節為扁槳型。青蟹屬特徵為頭胸甲區分不明顯，前側緣具 8~9 齒，最末側齒不大於其他各齒，前額有 4 齒呈波浪形，螯腳結實、掌部厚，背、腹面均不具隆脊。圓趾蟹屬特徵為前額具有 3~4 棘，雄性腹節明顯區分為 7 節，第二觸角基節可動，第四步腳指節為圓扁型 (黃, 1993)。儘管有了這些形態上重要的依據，但梭子蟹類在分類上仍具有許多問題，早期 Estampador (1949) 利用形態將青蟹屬分出四種，但由於青蟹屬形態差異不大，因此 Stephenson and Campbell (1960) 提出青蟹屬只有一種的主張，也受到許多當代學者支持；到了最近，Keenan 等 (1998) 收集各地的青蟹，利用傳統形態配合同功異構酶及粒線體 DNA 序列分析

*通訊作者 / 基隆市和一路 199 號, TEL: (02) 2462-2101; FAX: (02) 2463-3110; E-mail: sthsiao@mail.tfrin.gov.tw

方法，發現皆可以明確顯示青蟹屬包含有四個物種，即鋸緣青蟹 (*S. serrata*)、欖綠青蟹 (*S. olivacea*)、紫泥蟳 (*S. tranquebarica*) 和擬深穴青蟹 (*S. paramamosain*)。

許多蟹類外觀形態差異極小，分辨不易，因此在利用形態形質探討類緣關係時易因主觀的判斷，而產生不同的結果。黃 (1993) 研究中提到若要利用表型特徵推演出其演化關係仍嫌不足，故仍需要藉由生物化學及分子生物之技術做進一步探討。近年來分子生物學的方法已被廣泛的用來彌補形態分類上之不足，以及用來探討類緣演化的關係 (Chu *et al.*, 1999; Harrison and Crespi, 1999; Stillman and Reeb, 2001; Daniels *et al.*, 2002; Imai *et al.*, 2004; Tang *et al.*, 2003)。DNA 除了可作為物種鑑定以及物種類緣關係的一種指標外，不同的物種及目的可以選用適當的基因片段進行序列分析，進而建立整個演化樹形圖，從而了解物種間的演化訊息，甚至可以作為形態學上的佐證，而成為形態學分類的重要依據 (徐, 2006)。

粒線體 DNA (Mitochondrial DNA; mtDNA)；是一個小型且結構簡單的環狀 DNA，它的特色除了是經由母系遺傳外，其演化速率相對於染色體的 DNA 快很多，因此被研究人員廣泛的用來鑑定物種並探討其親源關係。近年來，利用分子技術對於蟹類 DNA 的研究已有更加深入的探討；Yamauchi *et al.* (2003) 解開了三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*) 的粒線體 DNA 基因的全序列編碼，發現到甲殼類基因間的位置跳動變化遠比魚類來的大許多。另外，亦有許多利用 DNA 探討蟹類分類上的問題，如邱等 (2001) 利用 16S rRNA 片段針對不同地區的絨螯蟹進行比較，發現中華絨螯蟹和日本絨螯蟹關係接近。孔等 (2001) 利用 COI 序列分析，支持存在中華絨螯蟹和日本絨螯蟹，或它們為同一種的兩個地理亞種的觀點。後來 Zhao 等 (2002) 和 Tang 等 (2003) 的研究中皆支持了孔等 (2001) 的結果。此外，孫等 (2003) 也將五種絨螯蟹類的基因序列進行比對，結果支持新絨螯蟹屬 (*Neoeriocheir*) 為一個獨立的屬，不支持扁絨螯蟹屬 (*Platyeriocheir*) 是一個有效的屬。由上述前人研究得知，利用 DNA 序列分析進行物種遺傳多樣性和類緣關係探討已成為現今的重要趨勢。然而近來 Jin *et al.* (2004) 利用

RAPD 分析法針對梭子蟹屬、蟳屬和青蟹屬等三屬進行類緣分析，結果發現青蟹屬、梭子蟹屬關係接近與蟳屬關係較遠；然而黃 (1993) 的研究中，利用形態特徵進行類緣分析結果發現台灣產梭子蟹科的蟳屬、梭子蟹屬關係接近與青蟹屬關係較遠，這樣的結果與 Jin *et al.* (2004) 不同。因此為釐清台灣產梭子蟹科中經濟蟹類 (蟳屬、梭子蟹屬、青蟹屬和圓趾蟹屬) 的類緣關係，本研究利用粒線體 DNA 中 16S rRNA 及 COI 兩段基因之核苷酸序列資料，配合前人形態上的觀察，來探討台灣產梭子蟹科經濟蟹類粒線體 DNA 遺傳多樣性及類緣關係，進而了解各種梭子蟹其種間的遺傳差異及其分類地位。

材料與方法

一、樣本採集與DNA萃取

本研究使用之八種梭子蟹科標本：遠海梭子蟹 (PP)、紅星梭子蟹 (PS)、銹斑蟳 (CF)、顆粒蟳 (*C. granulata*, CG)、欖綠青蟹 (SO)、鋸緣青蟹 (SS)、擬深穴青蟹 (SP)、細點圓趾蟹 (*Ovalipes punctatus*, OP) 皆採集於台灣各地漁市場 (Table 1)。採集所得之標本以 95% 的酒精溶液保存。取部分蟹類步腳肌肉組織約 20 mg 利用 DNA 萃取套組 (PUREGENE DNA Isolation Kit, Taiwan) 進行 DNA 萃取。

二、PCR、純化及定序反應

將所得之DNA作為模板，進行PCR反應增幅粒線體DNA中COI及16S rRNA序列，其中COI所使用的引子 (Primer) 為CruLeuR1 (5'-TCTTCCTD DTAGGAGCTTAAATCC-3') 和 Deca-trpF1 (5'-AAGTTAT(AC)TAAACT(AT)ATAGCCTTCAAA GCT-3')，16S rRNA引子為16Sar-L (5'-CGCCTG TTTATCAAAAACAT-3') 和 16Sbr-H (5'-CCGG TCTGAACTCAGATCACGT-3') (Palumbi, 1996)。每50 μ l PCR反應中，包含 10 ng 的樣本DNA、5 μ l 10倍反應緩衝液、5 μ l 之dNTP (8mM)、5 μ l 之氯化鎂 (25 mM)、10 pmole之16S rRNA及COI引子與 1.5 U之DNA聚合酵素 (*Taq Plus DNA polymerase*,

Table 1 List of the economically valuable crabs used in this study

Subfamily	Genus	Species	Chinese name	Sampling locality	Sample size
Macropininae	<i>Ovalipes</i>	<i>Ovalipes punctatus</i> (OP)	細點圓趾蟹	Keelung	5
				Ilan	5
Portuninae	<i>Scylla</i>	<i>Scylla olivacea</i> (SO)	欖綠青蟹	Pingtung	2
				Chiayi	3
		<i>Scylla serrata</i> (SS)	鋸緣青蟹	Tainan	3
				Pingtung	4
	<i>Scylla paramamosain</i> (SP)	擬深穴青蟹	Chiayi	4	
			Pingtung	2	
	<i>Portunus</i>	<i>Portunus pelagicus</i> (PP)	遠海梭子蟹	Kaohsiung	1
				Pingtung	5
				Chiayi	5
				Kaohsiung	4
Miaoli				3	
<i>Portunus sanguinolentus</i> (PS)		紅星梭子蟹	Chiayi	3	
			Pingtung	4	
			Tainan	5	
			Kaohsiung	5	
			Ilan	3	
<i>Charybdis</i>	<i>Charybdis feriatus</i> (CF)	銹斑蟊	Pingtung	4	
			Tainan	3	
			Chiayi	3	
			Ilan	4	
			Kaohsiung	4	
	<i>Charybdis granulate</i> (CG)	顆粒蟊	Kaohsiung	4	
			Ilan	3	
			Keelung	5	
			Miaoli	3	
			Pingtung	5	

Abbreviation for the species names are shown in brackets.

Lambda, St. Louis, MO, USA), 以聚合酵素連鎖反應器 (GeneAmp PCR system 2400) 進行DNA增幅反應, 其步驟如下: 以 94 °C 進行 2 分鐘變性 (Denature) 反應, 再以 94 °C 進行 30 秒、50 °C 進行黏合 (Annealing) 反應 1 分 30 秒, 72 °C 進行延長 (Extension) 反應 3 分鐘, 進行 30 個循環, 最後進行10分鐘72 °C延長反應, 以4 °C 保存 PCR 產物, 所得產物以 1.0% 洋菜膠於 1X TBE 緩衝液進行電泳確認, 最後以膠體純化套組 (Gel extraction kit; QIAGEN, Valencia, CA, USA) 進行純化。經純化後的PCR產物, 利用 Perkin Elmer 公司所提供的鏈終止序列分析法的套組 (big-dye

terminator ready reaction kit, PE Biosystems, Wellesley, MA) 進行核酸定序反應, 反應產物, 再以DNA自動定序儀 (biosystems 3730 DNA sequencer, Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) 進行雙向序列定序 (此核酸定序乃委託明欣生物科技有限公司)。

三、序列分析

DNA 序列片段以 CLC Gene Workbench 2.2.1 套裝軟體進行排序比對 (alignment), 所得的結果再作人為的排列調整。接著, 使用 MEGA 3.1

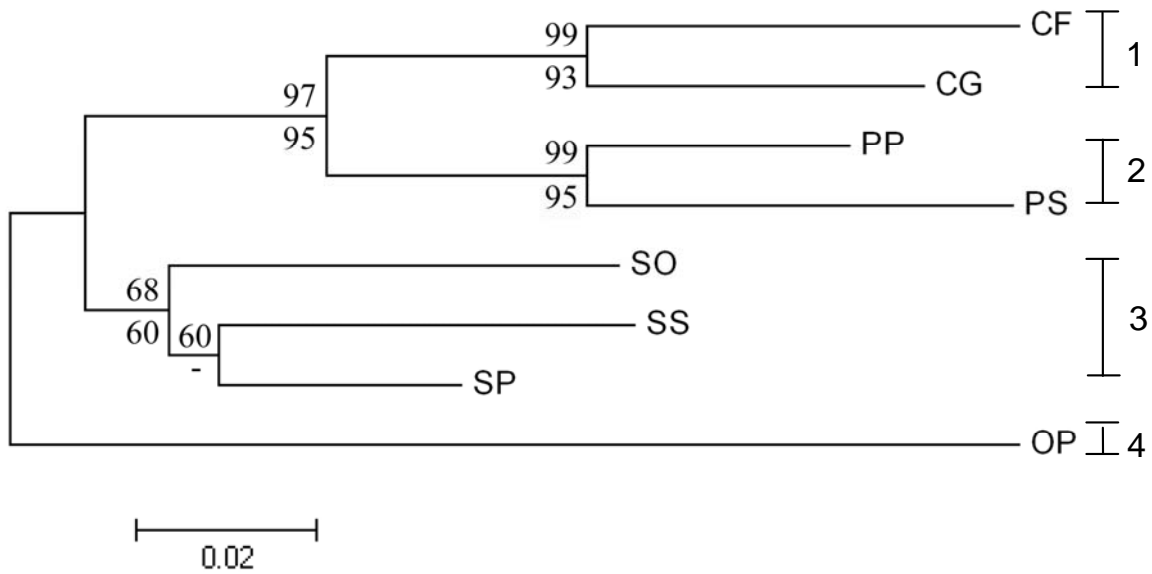


Fig. 1 Neighbor-joining (NJ) tree from partial mitochondrial 16S rRNA data of the crabs. Bootstrap proportion values (>50%) for NJ (top, 1000 replicates) and MP (bottom, 1000 replicates) are shown at the nodes, (-) indicates that bootstrap value below 50% in the analysis.

Table 3 Pairwise two-parameter distance matrix from the 504 bp portion of the mitochondrial 16S rRNA gene among the 8 species of economically important crabs

	1	2	3	4	5	6	7	8
SS	-							
CF	0.161	-						
CG	0.155	0.085	-					
OP	0.185	0.202	0.221	-				
PP	0.141	0.140	0.128	0.215	-			
PS	0.163	0.160	0.127	0.228	0.076	-		
SO	0.101	0.171	0.150	0.185	0.131	0.149	-	
SP	0.073	0.151	0.141	0.154	0.131	0.158	0.083	-

SS: *Scylla serrata*; CF: *Charybdis feriatius*; CG: *Charybdis granulata*; OP: *Ovalipes punctatus*; PP: *Portunus pelagicus*; PS: *Portunus sanguinolentus*; SO: *Scylla olivacea*; SP: *Scylla paramamosain*.

塊。序列各鹼基所佔比例，分別為 A：32.9 ~ 37.2%、T：33.1 ~ 36.1%、C：16.7 ~ 19.8% 及 G：10.9 ~ 13.5%。本研究將 16S rRNA 序列資料使用 NJ 和 MP 進行序列分析，所得的樹狀圖一致，因此以 NJ 分析法所得樹狀圖做為 16S rRNA 序列分析結果之代表 (Fig. 1)。觀察各種間的關係，得知台灣經濟蟹類可分為 4 群 (Group)，第 1 群包含有蟬屬的銹斑蟬 (CF) 和顆粒蟬 (CG)，第 2 群則有梭子蟹屬的遠海梭子蟹 (PP) 和紅星梭子蟹 (PS)，第 3 群為青蟹屬的欖綠青蟹 (SO)、鋸緣青

蟹 (SS) 和擬深穴青蟹 (SP)，第 4 群則為圓趾蟹屬的細點圓趾蟹 (OP)。這些類群皆具有高度的可信賴度支持 (bootstrap > 50)，各種間遺傳距離 (genetic distance) 介於 0.073 ~ 0.228 (Table 3)。

二、COI 序列分析

本研究中 8 種梭子蟹類所增幅之 COI 片段總長均為 1534 bp，將 8 種梭子蟹進行基因變異位點比較 (Table 4)，其變異位點並無特定的區塊。序列各鹼基所佔比例，分別為 A：24.3 ~ 27.4%、T：

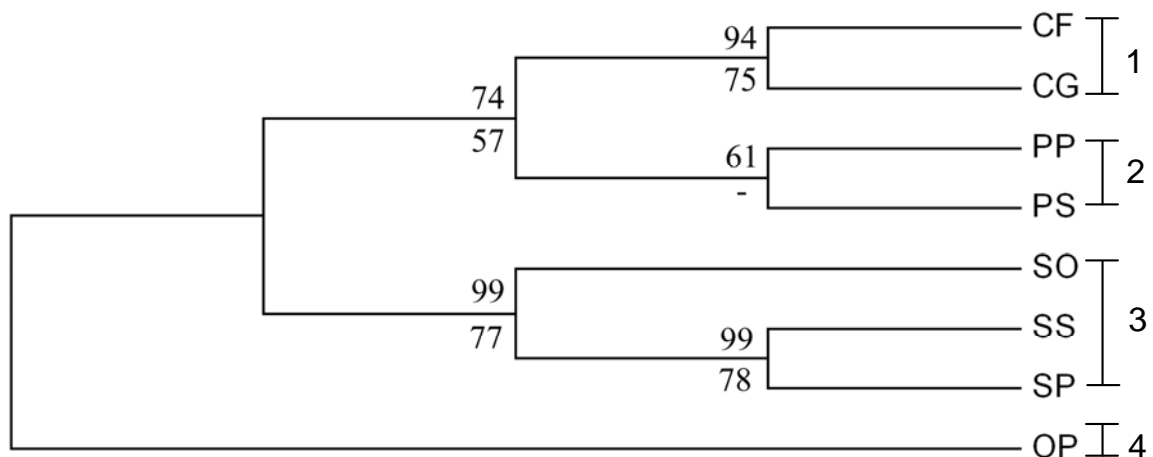


Fig. 2 Maximum parsimony (MP) tree from partial COI gene data of the crabs. Bootstrap proportion values (>50%) for NJ (top, 1000 replicates) and MP (bottom, 1000 replicates) are shown at the nodes, (-) indicates that bootstrap value below 50% in the analysis.

似的分析，但所得結果與本研究不同，他們利用 RAPD (Randomly amplified polymorphic DNAs) 標記法進行梭子蟹屬、青蟹屬和蟬屬進行親緣分析，發現青蟹屬與梭子蟹屬關係較為接近，與蟬屬關係較遠，這樣的結果支持了 Ng *et al.* (2001) 的分類系統。但 RAPD 的技術乃是利用 PCR 時，將大約 10 個鹼基的引子對特定目標基因進行隨機擴增，藉由擴增片段大小差異來進行物種鑑定及探討族群關係，這樣隨機擴增的結果對於實驗時重複的再現性將難以掌握 (Meunier and Grimont, 1993; Jones *et al.*, 1997)，如 Chamberlain *et al.* (1996) 利用 RAPD 及 ITS 序列進行石南屬 (*Rhododendron* spp.) 植物種間之親緣關係比較，發現以 RAPD 所得之親緣關係樹狀圖僅能在品種間，或者種之下的層級可正確歸群，且僅有 50% 的可信度。而以 ITS 序列進行類緣分析在種或屬內的層級皆可以有相當好的結果。因此，Peterson (1997) 認為若要進行類緣關係探討仍需要較多的 DNA 序列訊息；故本研究利用 COI 和 16S rRNA 兩段基因序列互相佐證，相信在探討台灣產 8 種梭子蟹類之類緣關係時，結果將更為明確。

儘管如此，在進行品系篩選時仍無法抹滅 RAPD 簡易快速的功勞，縱使粒線體 DNA 序列資訊較為豐富，但所耗費的時間跟資金亦較 RAPD 來的多，尤其在進行數量龐大的品系篩選時，RAPD 的特色將能完全的發揮。故針對不同目的

來選擇適當的分析方式，方能得到較為客觀的結果。

謝 辭

本研究係在行政院農業委員會計畫 95 農科-11.5.1-水-A1 經費補助下完成。研究期間承蒙本組前組長李定安博士以及莊世昌先生提供寶貴意見，謹此一併致謝。

參考文獻

- 孔曉瑜, 喻子牛, 劉亞軍 (2001) 中華絨螯蟹與日本絨螯蟹粒線體 COI 基因片段的序列比較之研究. 青島海洋大學報, 31 (6): 861-866.
- 邱高峰, 徐巧婷, 王麗卿, 范瑋, 陳雪菁 (2001) 四種絨螯蟹分子分類與系統發育. 動物學報, 47(6): 640-647.
- 徐敬明 (2006) 蟹類粒線體 DNA 的研究與應用. 中國海洋大學學報, 36 (6): 879-884.
- 孫紅英, 周開亞, 楊小軍 (2003) 從粒線體 16S rDNA 序列探討絨螯蟹類的系統發生關係. 動物學報, 49 (5): 592-599.
- 黃榮富 (1993) 台灣產梭子蟹類之分類及分布研究. 國立台灣海洋大學漁業科學研究所 博士論文, 174 pp.
- Chamberlain, D. (1996) The genus *Rhododendron*: It's Classification & Synonymy. Edinburgh: Royal Botanic Garden, Edinburgh, VIII, 181 p.

- Chu, K. H., J. Tong and T. Y. Chan (1999) Mitochondrial cytochrome oxidase I sequence divergence in some Chinese species of *Charybdis* (Crustacea: Decapoda: Portunidae). *Biochem. Syst. Ecol.*, 27: 461-468.
- Daniels, S. R., B. A. Stewart, G. Gouws, M. Cunningham and C. A. Matthee (2002) Phylogenetic relationships of the southern African freshwater crab fauna (Decapoda: Potamonautidae: *Potamonautes*) derived from multiple data sets reveal biogeographic patterning. *Mol. Phylogenet. Evolut.*, 25: 511-523.
- Estampador, E. P. (1949) Studies on *Scylla* (Crustacea: Portunidae). I. Revision of the genus. *Philippine J. Sci.*, 78 (1): 95-108. pls. 1-3.
- Felsenstein, J. (1985) Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, 39: 783-791.
- Harrison, M. K. and B. J. Crespi (1999) Phylogenetics of *Cancer* Crabs (Crustacea: Decapoda: Brachyura). *Mol. Phylogenet. Evolut.*, 12 (2): 186-199.
- Imai, H., J. H. Cheng, K. Hamasaki and K. I. Numachi (2004) Identification of four mud crab species (genus *Scylla*) using ITS-1 and 16S rDNA markers. *Aqua. Living Resources*, 17: 31-34.
- Jin, S., Q. S. Zhao, C. L. Wang and Y. E. Chen (2004) RAPD Genetic Markers in Six species of Marine crab. *Zool. Res.*, 25 (2): 172-176.
- Jones, C. J., K. J. Edwards and S. Castiglione (1997) Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. *Mol. Breeding*, 3 (5): 381-390.
- Keenan, C. P., P. J. F. Davie and D. L. Mann (1998) A revision of the genus *Scylla* deHaan, 1833 (Crustacea: Decapoda: Brachyura: Portunidae). *The Raffles Bull. Zool.*, 46 (1): 217-245.
- Kumar, S., K. Tamura and M. Nei (2004) MEGA 3: Integrated Software for Molecular evolutionary Genetics Analysis and Sequence Alignment. *Briefings Bioinform.*, 5: 150-163.
- Meunier, J. R. and P. A. Grimont (1993) Factors affecting reproducibility of random amplified polymorphic DNA fingerprinting. *Research in Microbiology*, 144: 373-379.
- Ng Peter K. L., C. H. Wang, P. H. Ho and H. T. Shih (2001) An annotated checklist of brachyuran crabs from Taiwan (Crustacea: Decapoda). *Nat. Taiwan Mus. Spe. Pub. Ser.*, No. 11, 86 pp.
- Palumbi, S. R. (1996) Nucleic acids II: the Polymerase chain reaction. *In* *Molecular Systematics* (D. M. Hillis, C. Moritz and B. B. Mable eds.), Sinauer Associates, Sunderland, MA, 205-247.
- Peterson, G. and O. Seberg (1997) Phylogenetic analysis of the Triticeae (Poaceae) based on *rpoA* sequence data. *Mol. Phylogenet. Evolut.*, 7: 217-230.
- Schubart, C. D., R. Diesel and S. B. Hedges (1998) Rapid evolution to terrestrial life in Jamaican crabs. *Nature*, 393: 363-365.
- Stephenson, W and B. Campbell (1960) The Australian Portunids (Crustacea: Portunidae) IV: remaining genera. *Australian J. Mar. Freshwater Res.*, 11(1): 73-122.
- Stillman, J. H. and C. A. Reeb (2001) Molecular phylogeny of Eastern Pacific Porcelain Crabs, Genera *Petrolisther* and *Pachycheles*, based on the mtDNA 16S rDNA sequence: Phylogeographic and systematic implications. *Mol. Phylogenet. Evolut.*, 19(2): 236-245.
- Swofford, D. L. (2002) PAUP* Phylogenetic Analysis Using Parsimony and other methods. Version 4.0b10. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Tang, B. P., K. Y. Zhou, D. Song, G. Yang and A. Dai (2003) Molecular systematics of the Asian Mitten crabs, genus *Eriocheir* (Crustacea: Brachyura). *Mol. Phylogenet. Evolut.*, 29: 309-316.
- Yamauchi, M. M., M. U. Miya and M. Nishida (2003) Complete mitochondrial DNA sequence of the swimming crab, *Portunus trituberculatus* (Crustacea: Decapoda: Brachyura). *Gene*, 311: 129-135.
- Zhao, J. L., R. W. Murphy and S. F. Li (2002) Relationships of mitten crabs (*Eriocheir*) from inland rivers of China inferred from cytochrome oxidase subunit I sequences. *Biochem. Syst. Ecol.*, 30: 931-941.

Phylogenetic Analyses of Eight Species of Portuniids of Taiwan Based on DNA Sequences of Mitochondrial COI and 16S rRNA

Hong-Yen Liang and Sheng-Tai Hsiao *

Marine Fisheries Division, Fisheries Research Institute

ABSTRACT

Portuniids is the most abundant decapod and also an important resource in crustacean fisheries in Taiwan. However, overfishing has resulted in a decline in the resource. Species identification for fishery resources management, trade and conservation of aquatic species are very important because identify taxa correctly and unambiguously are fundamental. The study was to develop a reliable database that can be used to distinguish different swimming crab species. Mitochondrial DNA 16S rRNA fragments and full sequence of COI gene of 8 crabs from Taiwan were amplified via PCR, and then were purified and sequenced. The phylogenetic tree constructed by using Neighbor-joining method showed that the relationship between genus *Portunus* and genus *Charybdis* is more closer than genus *Scylla*.

Key words: Portuniids, Mitochondrial DNA, COI, 16S rRNA, Phylogenetic analyses

*Correspondence: 199 Hou-lh Road, Keelung 202, Taiwan. TEL: (02) 2462-2101; FAX: (02) 2463-3110; E-mail: sthsiao@mail.tfrin.gov.tw