中国沿海龙虾属 8 种龙虾 COI 基因序列的分子系统学研究*

梁华芳[1,2]，徐晓鹏[1]，黄志坚[1]，翁少萍[1]，何建国[1]
（1. 中山大学生命科学学院，广东 广州 510275；
2. 广东海洋大学水产学院，广东 湛江 524088）

摘　要：我国沿海分布 8 种龙虾属的龙虾，为了研究其系统发育和筛选分类 DNA 条形码，对线粒体 COI 基因序列进行分析，用 MEGA4.0 软件计算遗传距离，采用邻接法（NJ）和最大简约法（MP）构建分子系统发育树。结果获得大小为 731 bp，GC 含量在 40.2% ~44.5%之间 COI 基因片段。8 种龙虾种内变异较小，遗传距离范围 0.00 ~0.057，平均 0.016；种间遗传距离较大，介于 0.124 ~0.228 之间，平均遗传距离为 0.185，种内和种间遗传距离相差约 10 倍。NJ 树和 MP 树都支持 8 种龙虾分成 2 支：密毛龙虾、长足龙虾和日本龙虾为一支，中国龙虾、杂色龙虾、黄斑龙虾、锦绣龙虾和波纹龙虾等 5 种龙虾为另一支。表明 COI 基因序列作为 DNA 条形码进行龙虾属的分类鉴定具有一定的可行性。

关键词：龙虾属；COI 序列；DNA 条形码；分子系统学
中图分类号：Q349+.1　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**0529 -6579（2011）06 -0094 -05

The Molecular Phylogeny on Eight Species of *Panulirus* Genus from the Chinese Coast Based on COI Gene Sequence

LIANG Huafang[1,2], *XU Xiaopeng*[1], *HUANG Zhijiang*[1], *WENG Shaoping*[1], *HE Jianguo*[1]
（1. School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China;
2. Fisheries College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025, China）

Abstract: To study the phylogeny and select a DNA barcode for classification, the mitochondrial COI genes of eight lobster species, belong to the genus *Panulirus*, distributing along the coast of China were sequenced and analyzed. The genetic distance was calculated using MEGA4.0, and the phylogenetic trees were constructed with Neighbor-Joining (NJ) and Maximum Parsimony (MP) methods. The obtained COI gene fragments were 731 bp with GC contents ranging from 40.2% to 44.5%. The intraspecific genetic distances of these eight species, ranging from 0.00 ~0.057 with an average of 0.016, are small, and the interspecific genetic distances, ranging from 0.124 to 0.228 with an average of 0.185, are more than ten times higher than those of intraspecies. Eight species of *Panulirus* can be divided into two branches by NJ tree and MP tree: *P. japonicus*, *P. longpies* and *P. penicillatus* belong to a same branch; *P. stimpsonic*, *P. polyphagus*, *P. versicolor*, *P. ornatus* and *P. homarus* belong to the other. The results indicated that the COI gene could be a useful DNA barcode for taxonomic identification of lobsters.

Key words: *Panulirus* genus; COI gene; DNA Barcode; molecular systematic

近年来的研究表明，线粒体 DNA 序列的差异可以作为不同物种划分的首要标准[1]。Herbert[2]

* **收稿日期：**2011 -02 -21
基金项目：广东省海洋渔业科技推广专项资助项目（A2010005 -024（b））
作者简介：梁华芳（1965 年生），男，副教授；**通讯作者：**何建国；E-mail：lsshjg@ mail. sysu. edu. cn

研究发现利用线粒体细胞色素 C 氧化酶亚基 Ⅰ（CO Ⅰ）基因一段长度为 648 bp 的片段，能够在 DNA 水平上成功的区分物种，并且认为利用 CO Ⅰ 基因从分子演化的角度，将提供一种快速、简便、可信的分类方法。这种方法逐步发展起来并被研究者命名为 DNA 条形码技术。Vences 等[3]探讨了 DNA 条形码对两栖爬行类物种的鉴定能力，结果显示选用的 CO Ⅰ 基因能够准确的辨别各物种。进一步研究表明利用 DNA 条形码能够对昆虫[4]、鱼类[5]、对虾类[6]、真虾类[7-8]和蟹类[9-12]进行有效的物种鉴别。在龙虾研究方面，Chow 等[13]用 RFLP（Restriction Fragment Length Polymorphisma）方法成功地对 10 种龙虾属的龙虾叶状幼体进行分类鉴定；Groeneveld 等[14]用 COI 基因序列研究了大西洋和印度洋中真龙虾属（Palinurus）的分子系统，确定了 6 种龙虾的亲缘关系。我国沿海龙虾属共有 8 种龙虾分布，它们都是经济价值较大的大型虾类，尽管成虾可用形态学方法进行分类，但需要较专业的技术人员才能完成，且其幼体阶段形态较为相近，不易辨认。因此，需要研究分子水平的鉴定方法，减少对形态特征的依赖。用 DNA 条形码能检测龙虾任何发育阶段样品，有助于龙虾的快速鉴定。目前对这 8 种龙虾分子分类方法和亲缘关系还没有系统报道。因此，本研究试图用 CO Ⅰ 序列建立我国海产龙虾属的 8 种龙虾 DNA 条形码和亲缘关系，为开展相关的分子分类提供依据。

1　材料与方法

1.1　实验材料

1.1.1　*样品来源和采集*　中国龙虾 *Panulirus stimpsoni*，锦绣龙虾 *P. ornatus*，波纹龙虾 *P. homarus*，杂色龙虾 *P. veersicolor*，黄斑龙虾 *P. polyphagus*，密毛龙虾 *P. penicillatus* 和长足龙虾 *P. longipes* 等 7 种龙虾样品来自广东湛江市和海南加积市、文昌市和三亚市。活体解剖取龙虾腹部的肌肉组织，每种龙虾 2 尾，－78 ℃冷藏备用。日本龙虾 *P. japonicus* 因找不到样品，在基因库中查找相应的序列进行分析。

1.1.2　*试剂和药品*　提 DNA 的试剂盒为 OMEGA 公司的 Tissue DNA kit，PCR 产物胶回收试剂盒 Del Extraction kit；Taq 酶、4 种 dNTPs 和 Marker（2000D）购自大连宝生物（Takara）公司，PCR 引物由上海英骏生物技术有限公司（invitrogen）合成。电泳的琼脂糖由 BIOWEST 公司生产。其它试剂均为国产分析纯。

1.2　实验方法

1.2.1　*DNA 的提取*　7 种龙虾 DNA 的提取方法按照 Tissue DNA kit 试剂盒上的指导书稍作调整，具体如下。

称取 100 mg 的龙虾肌肉组织，移入玻璃匀浆器中，加入 500 μL 的 Buffer TL，匀浆 10～15 次，把匀浆液移到 1.5 mL 的无菌 EP 管中；加入 50 μL 的 OB 蛋白酶摇匀，55 ℃消化 1～1.5 h；10 000 × g 离心 5 min，取上清，移入到新的 EP 管中；加入 220 μL Buffer BL，70 ℃水浴 10 min；加入 220 μL 的无水乙醇混合。转移到 Mini column 中，10 000 × g 离心 1 min；在 Mini column 中加入 500 μL Buffer HB，10 000 × g 离心 1 min；重复一次；在 Mini column 中加入 700 μL DNA Wash Buffer，10 000 × g 离心 1 min；再离心 10 000 × g，2 min；把 Mini column 移到一个新的 1.5 mL EP 管中，向其膜中加入 70 ℃预热的 Elution Buffer 100 μL；13 000 × g 离心 1 min，收集 DNA 样品，取少量进行电泳及浓度检测，其余的于 4 ℃冰箱中保存。

1.2.2　*PCR 扩增*　PCR 扩增用通用引物：L 1490：5′ → 3′ GGTCAACAAA TCATAAAGATATTGG；H2198：5′→3′ TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA。PCR 反应体系为 25 μL，扩增参数为：94 ℃预变性 5 min，98 ℃变性 10 s，47 ℃退火 20 s，72 ℃延伸 6 min，共 35 循环，最后 72 ℃延伸 7 min。产物用 $w = 1.0\%$ 琼脂糖凝胶电泳检验。用 Del Extraction kit 试剂盒纯化，于 4 ℃冰箱中保存。

1.2.3　*测序和分析方法*　实验的 7 种龙虾的 PCR 纯化产物由华大基因科技股份有限公司进行双向测序，人工校对。日本龙虾 CO Ⅰ 序列来源 GenBank 的 AF339461 和 AB071201。利用软件 CLUSTALX 1.8 对基因序列进行排序，并人工检验，截取同源片段，计算 CO Ⅰ 的 AT 和 CG 含量，分析龙虾 CO Ⅰ 序列的特点。用系统发生软件包 MEGA4.0 中的 Tamura and Nei 模型计算遗传距离；通过遗传距离的大小分析 8 种龙虾分子水平分类的可能性。

用龙虾科岩龙虾属的爱德华岩龙虾 *Jasus edwardsii* 的 CO Ⅰ 序列（序列编为 AF339473，FJ174951）和蝉虾科的东方扁虾 *Thenus orientalis* 的 COI 序列 DQ889173 做外群，构建邻接法（Neighbor-Joining，NJ）、最大简约法（Maximum Parsimony，MP）分子系统树并重复抽样分析（bootstrap analysis，Replications = 1 000）。

2 结　果

2.1 8 种龙虾 CO Ⅰ序列的特征

经 PCR 扩增，分别得到了 7 种龙虾长度约 680 bp 左右的 CO Ⅰ片段扩增产物，电泳图非常清晰（图 1）。扩增产物纯化直接测序。经测定并经核对校正，CO Ⅰ得到长度为 673 ~681 bp 的序列。

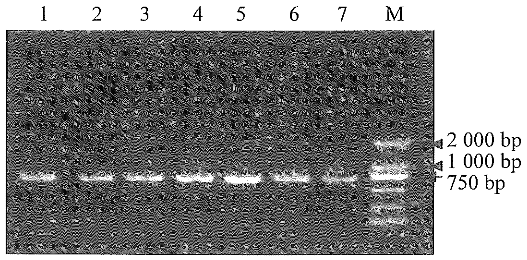

图 1　COI 基因片段 PCR 扩增结果

Fig. 1　PCR amplification results of mtDNA CO Ⅰ gene

1：中国龙虾；2：锦绣龙虾；3：波纹龙虾；4：长足龙虾；5：黄斑龙虾；6：杂色龙虾；7：密毛龙虾

通过比对，选 673 bp 进行核苷酸含量测定，8 种龙虾 GC 含量在 40.2% ~44.5% 之间，表明 AT 含量明显高于 CG 含量。

表 1　8 种龙虾 CO Ⅰ片段的碱基组成比例

Table 1　The content of A，G，T，C of mtDNA CO Ⅰ gene fragment among 8 *Panulirus* species

种类	T/%	C/%	A/%	G/%	（G+C）/%
中国龙虾	33.4	22.3	25.6	18.7	41
锦绣龙虾	33.4	21.0	25.4	20.2	41.2
波纹龙虾	34.3	20.5	25.0	20.2	40.7
长足龙虾	33.4	23.3	23.6	19.6	42.9
杂色龙虾	32.1	22.0	27.7	18.2	40.2
黄斑龙虾	34.3	22.1	24.7	18.9	41
密毛龙虾	30.8	25.0	24.4	19.9	44.5
日本龙虾	35.7	21.6	22.5	20.2	41.8

2.2 不同种类间的遗传差异

2.2.1　遗传距离　应用 MEGA4 软件计算龙虾 8 种单倍型间的 Kimura-2 参数遗传距离（表 2）。从表中可以看出，

龙虾种内的变异较小，遗传距离范围 0.00 ~0.057，平均 0.016，不同种类间遗传距离有大有小，在 0.124 ~0.228 之间，平均为 0.185，与种内的平均遗传距离相差 10 倍。波纹龙虾和锦绣龙虾的遗传距离最小，在 0.124 ~0.127 之间，中国龙虾和日本龙虾的遗传距离最大，达到 0.226 ~0.228 水平。

表 2　8 种龙虾的遗传距离

Table 2　Genetic distance among 8 *Panulirus* species for mtDNA COI

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
[1]																
[2]	0.006															
[3]	0.194	0.192														
[4]	0.194	0.192	0.010													
[5]	0.145	0.145	0.218	0.216												
[6]	0.150	0.150	0.216	0.214	0.007											
[7]	0.127	0.124	0.224	0.226	0.145	0.151										
[8]	0.126	0.125	0.213	0.215	0.155	0.156	0.057									
[9]	0.221	0.217	0.174	0.181	0.228	0.230	0.224	0.212								
[10]	0.223	0.219	0.172	0.179	0.230	0.232	0.226	0.214	0.007							
[11]	0.148	0.150	0.225	0.229	0.150	0.155	0.155	0.157	0.218	0.217						
[12]	0.148	0.150	0.225	0.229	0.150	0.155	0.155	0.157	0.218	0.217	0.000					
[13]	0.139	0.146	0.216	0.217	0.142	0.140	0.140	0.154	0.229	0.227	0.130	0.130				
[14]	0.143	0.150	0.212	0.214	0.143	0.142	0.145	0.152	0.223	0.222	0.129	0.129	0.009			
[15]	0.216	0.216	0.176	0.174	0.224	0.226	0.214	0.215	0.199	0.202	0.228	0.228	0.226	0.223		
[16]	0.216	0.216	0.176	0.174	0.224	0.226	0.214	0.215	0.199	0.202	0.228	0.228	0.226	0.223	0.000	

注：1 - 2：*P. homarus*；3 - 4：*P. longpies*；5 - 6：*P. polyphagus*；7 - 8：*P. ornatus*；9 - 10：*P. penicillatus*；11 - 12：*P. versicolor*；13 - 14：*P. stimpsoni*；15 - 16 ：*P. japonicus*

2.3 8 种龙虾的分子系统树

基于 CO Ⅰ序列，分别应用邻位相连法（Neighbor Joining）和最大简约性法（Maximum Parsimony methods）构建了 NJ 和 MP 系统发育树如图 2 和图 3 所示，在 NJ 树和 MP 树中，都可以看出龙虾属的 8 种龙虾与其他属（岩龙虾属）的龙虾形成了 2 个分支，说明形态上把这 8 种龙虾分成同一属，与分子系统的结果一致。8 种龙虾分成 2 支：密毛龙虾、长足龙虾和日本龙虾为一支，杂色龙虾、中国龙虾、黄斑龙虾、波纹龙虾和锦绣龙虾为另一支。在第一分支中，NJ 树中长足龙虾和日本龙虾首先聚在一起，再与密毛龙虾构成姐妹群，但 MP 树并不支持这一结论，3 种龙虾并列地组成

姐妹群。在第二分支中，NJ 树和 MP 树都得到相同的结论，波纹龙虾和锦绣龙虾聚成一群，构成一个姐妹群，杂色龙虾、中国龙虾和黄斑龙虾聚成一群，构成另一个姐妹群，杂色龙虾和中国龙虾的亲缘关系最近。

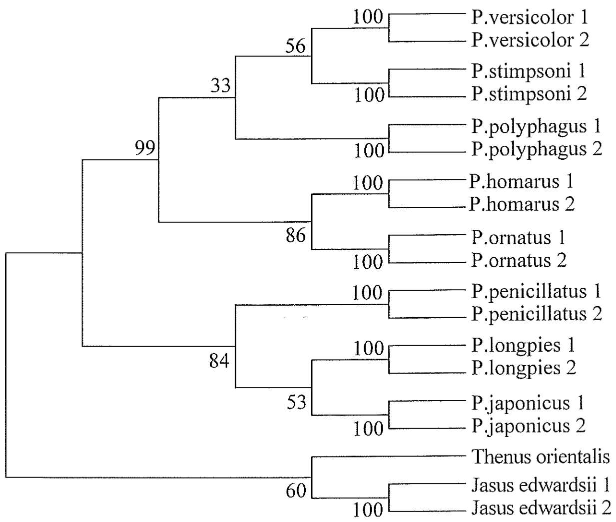

图 2　基于 COI 基因序列 8 种龙虾 NJ 进化树

（爱德华岩龙虾和东方扁虾为外群）

Fig. 2　NJ tree of eight *Panulirus* species based on COI genes sequence

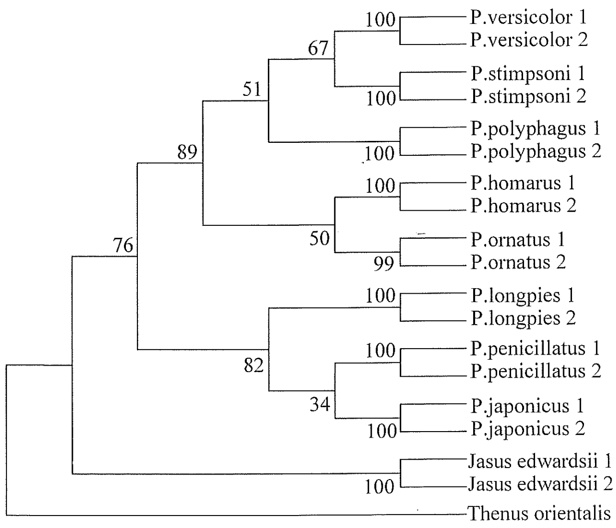

图 3　基于 COI 基因序列的龙虾属 8 种龙虾 MP 树

（爱德华岩龙虾和东方扁虾为外群）

Fig. 3　MP Tree of eight *Panulirus* species based on COI genes sequence

3　讨　论

用通用引物能顺利扩出 8 种龙虾 COI 基因序列，它们的 GC 含量在 40.2% ~44.5% 之间，AT 含量在 55.5% ~59.8% 之间，表明 AT 含量明显高于 CG 含量。这与许多虾类和蟹类的 COI 基因中观察到的结果相似，是高等无脊椎动物线粒体序列中普遍存在的现象[6-13]。

Hebert 等[15]为考察 DNA 条形码的有效性对 260 种鸟类进行 CO Ⅰ序列测定，研究结果显示鸟类中发现 CO Ⅰ基因序列在种间的差异远大于种内的差异，几乎达到 19 ~24 倍，表明利用 CO Ⅰ序列的 DNA 条形码研究能够有效的对此类群物种进行鉴定。据此结果并提出以种间遗传变异高于种内变异 10 倍差异为 DNA 条形码进行物种鉴定的标准序列极限。Hebert 等[16]得出进行物种鉴定的 DNA 条形码基因其物种内的遗传距离很少有大于 2% 的，大部分的种内距离小于 1% 。这些研究为寻找和检验其他类群的 DNA 条形码基因提供了一个可以借鉴的标准。基于这一标准，周晓犊等[17]对中国鲚属物种进行有效鉴定；陈军等[18]和辛翠娜等[20]分别建立了鉴定中国沿海缀锦蛤亚科贝类和龟鳖类的 DNA 条形码。本研究的结果表明，同种个体能聚在一起，个体间遗传距离小，范围在 0.00 ~0.057 之间，平均 0.016，种间遗传距离大，在 0.124 ~0.228 之间，平均值为 0.185，两者相差约 10 倍。因此，用遗传距离差别种内和种间关系是可行的。初步推断，用 CO Ⅰ序列可以建立龙虾属内 8 种龙虾的 DNA 条形码。

Chow 等[13]用 RFLP 的方法，研究西北印度洋的 10 种龙虾叶状幼体的分类，得到的结论是，10 种龙虾 NJ 树和 MP 树都分成 2 支，中国龙虾、杂色龙虾、锦绣龙虾，波纹龙虾、黄斑龙虾、*P. inflatus* 和 *P. reglus*，另一支为日本龙虾，密毛龙虾，长足龙虾、*P.* “*aka*” 和 *P. marginatus* 等，与我们的结果非常吻合，杂色龙虾、中国龙虾、黄斑龙虾、波纹龙虾和锦绣龙虾为一支，密毛龙虾、长足龙虾和日本龙虾为另一支。日本龙虾，密毛龙虾和长足龙虾在台湾产量较高，密毛龙虾在我国只有东海分布，它们合为一支与其生态分布密切相关。

龙虾属的分类主要依据龙虾腹部横沟的有无、横沟的形状和触角板上刺的多少进行分类。本研究中用遗传距离和聚类的方法，得到了我国 8 种龙虾的亲缘关系，密毛龙虾、长足龙虾和日本龙虾亲缘关系较近，3 种龙虾都有横沟，与形态学上基本一致。另外 5 种龙虾：杂色龙虾、中国龙虾、黄斑龙虾、波纹龙虾和锦绣龙虾聚在一起，其中中国龙虾、杂色龙虾和黄斑龙虾和锦绣龙虾身体腹部背甲

上无横沟，与形态学上分类特征相符，但腹部背面有横沟的波纹龙虾和它们在同一分支上，这点形态学和分子分类学很难结合起来。

参考文献：

[1] WIENS J J, PENKROT T A. Delimiting species using DNA and morphological variation and discordant species limits in spiny lizards (*Sceloporus*) [J]. Systematic Biology, 2002, 51: 69-91.

[2] HEBERT P D N, RATNASINGHAM S J R. Barcoding animal life: cytochrome C oxidase subunit 1 divergences among closely related species [J]. Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences. 2003, 270:96-99.

[3] VENCES M, THOMAS M, BONETT R M, et al. Deciphering amphibian diversity through DNA barcoding: chances and challenges [J]. Philosophical Transactions of the Royal Society of London series B-biological Sciences, 2005, 360: 1859-1868.

[4] ZHAO Ling, ZHENG Zhemin, HUANG Yuna, et al. Phylogeny of the Chinese Cantatopidae (Orthopter: Acridoidea) Inferred from Mitochondrial DNA Sequences [J]. 中山大学学报:自然科学版,2010,49(4):111-117.

[5] WARD R D, ZEMLAK T S, INNES B H, et al. DNA barcoding Australia's fish species [J]. Philosophical Transactions of the Royal Society of London series B-biological Sciences, 2005, 360:1847-1857.

[6] 麦维军,谢珍玉,张吕平,等. 中国明对虾与5种虾类线粒体16S rRNA和COI基因片段的序列比较及其系统学初步研究[J]. 海南大学学报:自然科学版, 2009,27(1):15-23.

[7] 杨频. 中国沼虾属分子系统学及日本沼虾群体遗传结构的研究[D]. 上海:华东师范大学,2007.

[8] ZHANG Qingyi, CHENG Qiqun, GUAN Weibing. Mitochondrial COI Gene Sequence Variation and Taxonomic Status of Three *Macrobrachium* Species [J]. 动物学研究, 2009, 30(6):613-619.

[9] 郭天慧,孔晓瑜,陈四清,等. 三疣梭子蟹线粒体DNA16S rRNA和COI基因片段序列的比较研究[J]. 中国海洋大学学报, 2004,34(1):22-28.

[10] 孔晓瑜,喻子牛,刘亚军,等. 中华绒螯蟹与日本绒螯蟹线粒体COI基因片段的序列比较研究[J]. 青岛海洋大学学报,2001,31(6):861-866.

[11] 马凌波,张凤英,乔振国,等. 中国东南沿海青蟹线粒体COI基因部分序列分析[J]. 水产学报,2006,30(4):463-468.

[12] 林琪,李少菁,黎中宝,等:中国东南沿海青蟹属不同种类的mtDNA COI基因序列分析及其系统发育[J]. 厦门大学学报:自然科学版,2008,47(2):268-273.

[13] CHOW S, SUZUK N, IMAI H, et al. Molecular species identification of spiny lobster phyllosoma larvae of the genus *Panulirus* from the northwestern Pacific[J]. Marine Biology, 2006 (8):260-267.

[14] GROENEVELD J C, GOPAL K, GEORGE R W, et al. Molecular phylogeny of the spiny lobster genus *Palinurus* (Decapoda: Palinuridae) with hypotheses on speciation in the NE Atlantic/Mediterranean and SW Indian Ocean [J]. Molecular Phylogenetics and Evolution 2007, 45: 102-110.

[15] HEBERT P D N, STOECKLE M Y, ZEMLAK T S, et al. Identification of birds through DNA barcodes[J]. Plos Biology,2004, 2 (10):1657-1663.

[16] HEBERT P D N, CYWINSKA A, BALL S L,et al. Biological identification through DNA barcodes[J]. Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences, 2003, 270:313-321.

[17] 周晓犊,杨金权,唐文乔,等. 基于线粒体COI基因DNA条形码的中国鲚属物种有效性分析[J]. 动物分类学报,2010,35(4): 819-826.

[18] 陈军,李琪,孔令锋,等. 基于COI序列的DNA条形码在中国沿海缀锦蛤亚科贝类中的应用分析[J]. 动物学研究,2010,31(4): 345-352.