

DOI: 10.12264/JFSC2022-0284

基于线粒体 CO I 基因和形态学方法的 3 种梭子蟹科溞状幼体物种鉴定

张新贵¹, 何天庆¹, 叶振江¹, 王艺翰¹, 张文超¹, 熊文清¹, 曲宁新¹, 蒋慧东¹, 卢志光²

1. 中国海洋大学水产学院, 山东 青岛 266003;

2. 日照山海天旅游度假区海洋发展局, 山东 日照 276827

摘要:为调查黄海蟹类资源情况, 并识别梭子蟹科溞状幼体各阶段形态, 利用 2018 年 5 月下旬至 8 月上旬在黄海海州湾及邻近水域的鱼类浮游生物大面综合调查获得的海洋蟹类幼体样品, 基于线粒体 CO I 基因和形态学方法对梭子蟹科溞状幼体种类进行了鉴定。结果显示, 春夏季调查水域共出现 3 种梭子蟹科幼体: 三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)、日本螯(*Charybdis japonica*)和双斑螯(*Charybdis bimaculata*); 线粒体 CO I 基因测序可准确识别 3 个物种。对 3 种梭子蟹溞状幼体的形态学观察结果表明, 背棘与额棘形态、尾叉外缘小刺的有无可作为区分上述 3 种梭子蟹溞状幼体的主要形态学指标。根据 3 个物种幼体形态特征建立了梭子蟹科溞状幼体分类检索表, 基于检索表对幼体进行分类鉴定, 并选择 8 月上旬航次形态学鉴定的 80 个三疣梭子蟹溞状幼体、24 个日本螯溞状幼体、70 个双斑螯溞状幼体样品进行分子测序验证。结果表明, 上述 3 种蟹类溞状幼体的形态学鉴定准确率分别达到 93.75%、100% 和 97.14%, 误判皆发生于溞状幼体 I 期梭子蟹科 3 个物种之间。研究初步建立了黄海中部梭子蟹科溞状幼体形态鉴定标准, 为后续梭子蟹类早期生活史的研究奠定了基础, 有助于促进海洋蟹类资源动态的研究与资源的可持续利用。

关键词: 黄海; 梭子蟹科; 溞状幼体; 鉴定; 形态; CO I 基因

中图分类号: S931

文献标志码: A

文章编号: 1005–8737–(2023)02–0218–08

梭子蟹科是海洋生态系统中的重要生物类群, 其物种数较多, 具有重要的经济和生态地位^[1–3]。因生命周期较短, 其早期生活史过程易受环境变化影响, 并进一步影响渔业群体资源量^[4], 研究其早期生活史过程及对环境的响应机制对解析其资源动态机制, 加强资源的保护、管理与科学利用具有重要意义。长期以来, 国际上对包括梭子蟹科在内的海洋蟹类的早期生活史过程已经做了不少探索。以形态学鉴定为基础^[5–7], 就亲蟹繁殖、幼体发育、生长、死亡、栖息地分布、幼体输运等诸多个方向开展了工作^[8–17], 特别对个别重要经

济梭子蟹科种类如蓝蟹(*Callinectes sapidus*), 对其早期生活史进行了较为系统和深入的研究, 为蓝蟹资源的管理与开发奠定了科学基础^[18–20]。而在国内, 数十年以来对海洋蟹类早期生活史的基础研究十分薄弱, 目前仅有对三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)、日本螯(*Charybdis japonica*)、天津厚蟹(*Helice tientsinensis*)等少数蟹类幼体发育过程的零星报道^[21–28], 梭子蟹科及其他海洋蟹类幼体发育信息不全, 幼体形态鉴定资料匮乏, 导致其早期生活史的系统研究无法开展。目前国内学术界仅对长江流域淡水蟹类中华绒螯蟹(*Erio-*

收稿日期: 2022-09-02; **修订日期:** 2022-11-12.

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFD0900903); 国家自然科学基金项目(41876177).

作者简介: 张新贵(1998–), 男, 硕士研究生, 研究方向为渔业资源生物学. E-mail: 1416522419@qq.com

通信作者: 叶振江, 博士, 教授, 研究方向为渔业资源生物学与早期生活史. E-mail: yechen@ouc.edu.cn

cheir sinensis)的早期补充有一些报道^[29-32], 不利于对海洋梭子蟹科等生物资源的科学保护、合理开发与可持续利用。

黄海海州湾及邻近水域是梭子蟹科种类的重要产卵场和育幼场, 渔业生态地位十分重要。本研究以该水域 2018 年春夏季鱼类浮游生物与环境大面综合调查获得的梭子蟹类幼体样品为基础, 利用线粒体 CO I 基因测序和形态学方法开展梭子蟹科幼体生物多样性和分类鉴定的研究, 探索建立梭子蟹科蚤状幼体不同发育阶段的形态学检索表, 旨在建立和完善基于形态学方法的梭子蟹类幼体物种鉴定标准, 为系统开展三疣梭子蟹、日本蟳等经济梭子蟹类资源的早期生活史研究, 科学保护和开发梭子蟹类生物资源提供基础。

1 材料与方法

1.1 调查航次与站位设置

大面调查于 2018 年 5 月下旬至 8 月上旬于黄海海州湾及邻近水域进行, 共 6 个航次, 每半月进行 1 次。其中前 4 个航次设置 49 个站位, 后 2 个航次设置 31 个调查站位(详见图 1), 在各个站位进行蟹类幼体丰度与环境观测。生物样品采集使用大型浮游生物网(网口直径 130 cm, 网目孔径 0.505 mm, 网衣长 470 cm)进行, 每个站位以 3 kn 左右船速拖网 10 min, 网口系流量计以校正滤水

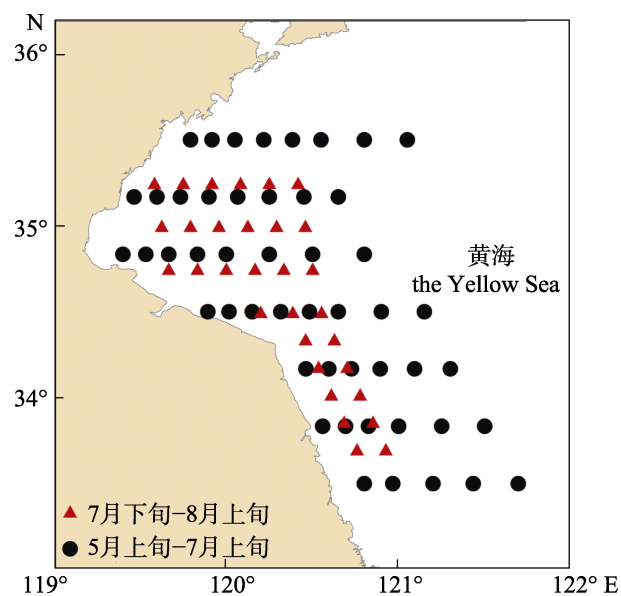


图 1 大面调查站位分布
Fig. 1 The sampling stations of field survey

量。海洋环境观测利用 CTD 进行(型号: 德国 Sea & Sun Technology 公司 CTD-75M 型), 以获取温度、盐度的垂直剖面数据。生物样品采集后现场马上利用 95%乙醇进行固定, 调查结束后带回实验室, 在体视显微镜下挑出蟹类幼体样品, 进行后继处理与分析。

1.2 蟹类幼体线粒体 CO I 基因测序

为精确鉴定蟹类物种, 及检验幼体形态学鉴定的准确性, 利用分子生物学方法对样品进行检验。

实验使用南京诺唯赞有限公司的细胞、组织 DNA 纯化试剂盒(Fast Pure Cell/Tissue DNA Isolation Mini Kit)进行 DNA 提取。将幼体样品在 1.5 mL 灭菌离心管中用研磨棒碾碎, 加入 20 μ L Proteinase K 组织酶解液, 55 $^{\circ}$ C 下金属浴消化过夜, 使用洗脱剂进行蛋白质和离子洗脱并重复 2 次纯化 DNA。将吸附柱置于灭菌离心管中, 使用预热到 70 $^{\circ}$ C 的洗脱缓冲液收集 DNA 至离心管。成蟹样品剪取螯足肌肉用于 DNA 收集。使用 Nanodrop 2000 分光光度计检测 DNA 的浓度和纯度。CO I 基因序列扩增使用无脊椎动物通用引物 LCO1490 和 HCO2198^[33], 由华大基因科技股份有限公司合成:

LCO1490: 5'-GGTCAACAAATCATAAAGAT-ATTGG-3'

HCO2198: 5'-TAAACTTCAGGGTGACCAA-AAAATCA-3'

PCR 反应体系总体积为 25 μ L, 包括 2 $\times$ Easy Taq Mix 12.5 μ L, LCO1490 和 HCO2198 引物 (10 μ mol/L)各 1 μ L, DNA 模板 2.5 μ L, 双蒸水 8 μ L。PCR 反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 49 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 循环 35 次; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

将测序得到的 CO I 基因序列在 DNASTAR 软件中进行比对分析, 查看序列峰图, 将不可信区域切除。将处理好的线粒体 CO I 基因序列在数据库中比对获取物种的鉴定结果。将处理后的蟹类幼体序列与成体蟹类序列进行比对以进一步进行验证。使用 DNASP 软件对所有序列进行统计, 分析蟹类幼体样品 CO I 基因序列的单倍型数量以及遗传多样性。基于 Kimura 2-parameter 算法在 MEGA 软件中计算蟹类幼体单倍型间的遗传距离, 构建 NJ 系统发育树, 采用 bootstrap 法重复 1000 次检验各分支的置信度, 分析 3 种蟹类的系统发

育与亲缘关系。

对 6 个航次调查获得的蟹类溞状幼体和大眼幼体样品中,首先选取整体完整、形态清晰的蟹类幼体 150 余个进行形态学观察和记述,利用尼康 SMZ18 体视显微镜及 CCD 图像采集系统进行幼体图像采集,随后进行线粒体 CO I 基因测序,以确定出现的梭子蟹科物种。

1.3 梭子蟹科溞状幼体形态学鉴定与验证

参照孙颖民等^[23]和廖永岩等^[24]对三疣梭子蟹、阎愚等^[28]对日本蟳、及 Hwang 等^[33]对双斑蟳幼体发育各期的描述,同时参考廖永岩等^[25]对远海梭子蟹(*Portunus pelagicus*)幼体发育各期的描述(海州湾虽无分布,但与三疣梭子蟹亲缘关系较近,可作为三疣梭子蟹形态学参考),在 Nikon E-200 型体视显微镜下,对分子测序确认的 3 种梭子蟹科幼体种类进行形态观察,筛选典型形态特征建立物种的形态分类检索表。

梭子蟹科不同物种幼体发育过程不同。其中,三疣梭子蟹幼体发育经历 4 期溞状幼体和 1 期大眼幼体^[23],日本蟳经历 6 期溞状幼体和 1 期大眼幼体^[28],双斑蟳有 7 期溞状幼体和 1 期大眼幼体^[33]。

为检验形态分类检索表的分类效果,考虑不同物种形态识别难度的差异,在 8 月航次的样品中形态鉴定和挑选三疣梭子蟹溞状幼体 80 个(每期 20 个),日本蟳溞状幼体 24 个(每期 4 个),双斑蟳溞状幼体 70 个(每期 10 个),进行 CO I 基因序列测定以验证形态学分类准确性。对梭子蟹科大眼幼体 14 个进行基因测序定种,进行形态学初步观察。后期共对 188 个梭子蟹科幼体进行了分子生物学测序分析。

2 结果与分析

2.1 梭子蟹科幼体物种组成

结果显示,调查海域 5—8 月梭子蟹科幼体共出现 3 种,三疣梭子蟹、日本蟳和双斑蟳。其中双斑蟳的数量占据绝对优势。

2.2 梭子蟹科幼体的形态鉴定

海洋蟹类幼体形态包括头胸甲,头部附肢(第 1 触角、第 2 触角、大颚、第 1 小颚、第 2 小颚),胸部附肢(第 1 颚足、第 2 颚足、第 3 颚足、步足),腹节及游泳足(pleopods),和尾节部分。3 种蟹类溞状幼体形态如图 2~4 所示。

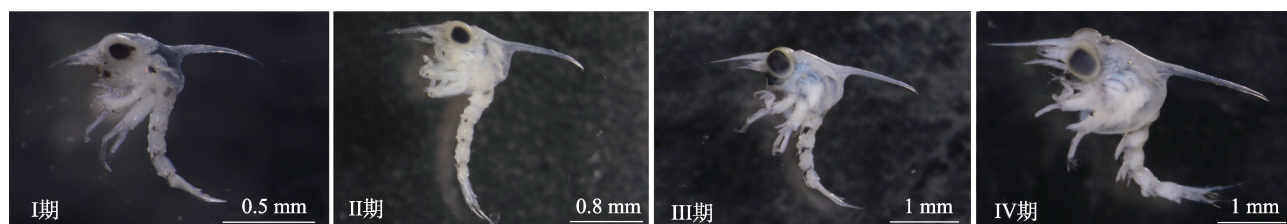


图 2 三疣梭子蟹溞状幼体形态
Fig. 2 Zoeas of swimming crab, *Portunus trituberculatus*

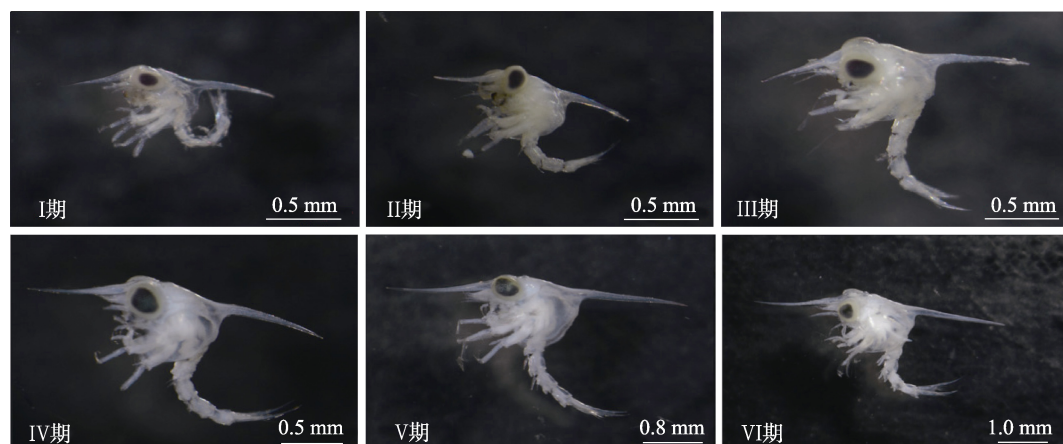


图 3 日本蟳溞状幼体形态
Fig. 3 Zoeas of swimming crab, *Charybdis japonica*

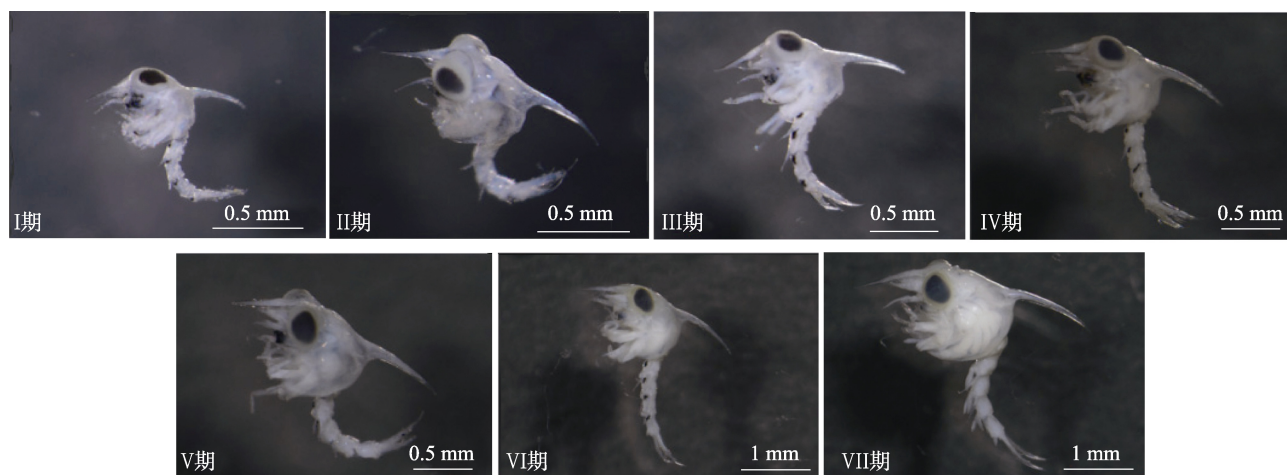


图4 双斑蟳溞状幼体形态

Fig. 4 Zoeas of swimming crab, *Charybdis bimaculata*

蟹类幼体每发育一个阶段都经历一次蜕皮。梭子蟹类溞状幼体不同发育阶段的形态分类指标主要包括体长、颚足外肢末端羽状刚毛数、尾巴上的刚毛数、步足萌芽时期、腹肢萌芽时期等。

根据对 3 种梭子蟹科溞状幼体形态观察结果,建立该科溞状幼体分类检索表如下:

1 (2) 尾叉外缘小刺极小或不可见....日本蟳;

2 (1) 尾叉外缘小刺明显可见;

3 (4) 背棘与额棘长而细,背棘末端显著弯成钩状.....三疣梭子蟹;

4 (3) 背棘与额棘短而粗,背棘末端不呈钩状.....双斑蟳。

2.3 线粒体 CO I 基因序列与系统进化分析

188 个开展分子和形态鉴定的幼体样品中,有 179 个样品两种鉴定结果相一致。该 179 个 CO I 基因序列共有 67 个单倍型,单倍型的多样性(Hd)为 0.904,多样性方差为 0.00014,共 176 个变异位点。所有序列在数据库中比对结果相似度均高于 99%。

基于 179 条蟹类幼体基因序列和 6 条预实验的蟹类成体基因序列,利用 185 条 CO I 序列进行聚类分析显示,75 个三疣梭子蟹幼体、27 个日本蟳幼体、77 个双斑蟳幼体序列都与各自成体聚为独立的分支,置信度为 99%。

对鉴定到种的 67 个 CO I 基因单倍型进行分析显示,三疣梭子蟹的种内遗传距离 0.000~0.034,平均为 0.004;双斑蟳的种内遗传距离 0.000~0.139,平均为 0.067;日本蟳的种内遗传距离

0.000~0.015,平均为 0.000。种间遗传距离中,三疣梭子蟹与双斑蟳间为 0.189~0.204,平均 0.195;三疣梭子蟹与日本蟳间为 0.179~0.205,平均 0.182;双斑蟳与日本蟳间为 0.133~0.141,平均 0.138。总体种间遗传距离约为种内遗传距离的 51 倍。

80 个形态鉴定为三疣梭子蟹溞状幼体的样品中,75 个个体分子鉴定验证为正确,有 I 期溞状幼体 4 个被错认为日本蟳、1 个被错认为双斑蟳,准确率 93.75%;24 个形态鉴定为日本蟳的溞状幼体样品分子验证结果正确,准确率 100%;70 个形态鉴定为双斑蟳溞状幼体的样品有 68 个分子验证结果正确,有 2 个 I 期溞状幼体分别被错判为三疣梭子蟹和日本蟳,准确率 97.14%。

14 个梭子蟹科大眼幼体中,三疣梭子蟹仅 1 个,其余为日本蟳和双斑蟳大眼幼体。

3 讨论

3.1 梭子蟹类幼体形态鉴定标准

本研究结果显示,调查海域 5—8 月梭子蟹科幼体仅出现三疣梭子蟹、日本蟳和双斑蟳 3 种。虽然体长、颚足外肢末端羽状刚毛数、尾巴上的刚毛数、步足萌芽时期、腹肢萌芽时期等特征是各物种溞状幼体不同发育阶段记述的主要形态特征(表 1),但本研究结果显示尾叉外缘小刺、背棘与额棘形状是鉴别黄海中部梭子蟹科这 3 种溞状幼体的有效形态特征,据此对其进行形态分类具有很高的实用性和准确度。3 种梭子蟹类溞状幼

体形态分类皆达到较高的精度，个别误判发生于三疣梭子蟹和双斑螳的 I 期蚤状幼体阶段，这可能与该发育期幼体个体较小，及观察角度不同、个别个体形态完整性受损等因素有关。

表 1 4 种梭子蟹及 2 种方蟹蚤状幼体主要形态特征
Tab. 1 Morphological characteristics of zoeas of four Portunidae crabs and two Grapsidae crabs

种类 species	期别 stage	第 1 颚足外肢末端 羽状刚毛数 terminal plumose setae of exopod of the first maxilliped	第 2 颚足外肢末端羽状 刚毛数 terminal plumose setae of exopod of the second maxilliped	尾凹刚毛数 setae of telson forks	步足萌芽时期 periopods development stage	腹肢萌芽时期 pleopods development stage	数据 来源 reference
梭子蟹科 Portunidae	三疣梭子蟹 <i>Portunus trituberculatus</i>	I 4	4	6	II	III	[23]
	II	6	6	6+2*			
	III	10	10-11	6+2			
	IV	13-14	14-16	6+3			
	远海梭子蟹 <i>Portunus pelagicus</i>	I 4	4	6	II	III	[25]
	II	8	8	6+2			
	III	10	10	6+2			
	IV	12	13-14	6+3			
	V	12	14	6+3			
	梭子蟹科 Portunidae 日本螳 <i>Charybdis japonica</i>	I 4	4	6	IV	V	[28]
	II	6	6	6+2			
	III	8	8	6+3			
	IV	9-10 11-12	10-11 13-14	6+3 6+3			
	V	13-14	15-16	6+4			
	VI						
	双斑螳 <i>Charybdis bimaculata</i>	I 4	4	6	V	VI	[33]
	II	6	6	6+2			
	III	8	8	6+2			
	IV	10	10	6+2			
	V	12-13	12-13	6+2			
	VI	14-15	14-15	6+2			
	VII	16-18	16-18	6+3			
方蟹科 Grapsidae	狭额绒螯蟹 <i>Eriocheir leptognathus</i>	I 4	4	6	III	III	[22]
	II	6	6	6			
	III	8	8	8			
	IV	10	10	8			
	V	12	12	8			
	天津厚蟹 <i>Helice tientsinensis</i>	I 4	4	6	IV	IV	[21]
	II	6	6	6			
	III	8	8	8			
	IV	10	10	8			
	V	12	12	10			

注: 6+2*表示尾叉内缘刚毛数为 6, 尾凹中部刚毛数为 2.
Note: 6+2* means that 6 setae on the inner edge of the tail fork, and 2 setae in the middle of the caudal concave.

本研究仅针对黄海中部局部海域春夏季节, 样品生物多样性存在调查时空范围较小的局限性。2018 年度相关海域的调查涉及 5 月下旬至 8 月上旬共 6 个航次, 经初步分子生物学鉴定, 梭子蟹科幼体仅出现上述 3 个物种, 因此本研究结果可初步作为本区域蟹类幼体形态鉴定的标准应用于后续研究。有报道认为, 三疣梭子蟹幼体发育过程中有

可能存在第 V 期个体^[23]。本研究样品处理过程中, 亦发现有疑似个别三疣梭子蟹蚤状幼体, 体长明显大于 IV 期个体。限于样品数量不足, 未对此进行深入分析, 并在本研究中继续使用了三疣梭子蟹蚤状幼体 4 期划分标准^[23-24]。后续工作将开展专项调查补充研究样品, 借助形态学观测、分子测序等手段, 进一步确认三疣梭子蟹幼体发育的基本过程。

3.2 线粒体 CO I 基因测序在海洋蟹类形态分类方面的应用

国际上对海洋蟹类幼体形态分类已有一些研究报道。幼体头胸甲形态, 额棘、背棘及侧棘的有无、朝向、长度和粗细程度, 头部附肢、胸部附肢的结构和形态, 各部位刚毛模式, 尾节形状及侧棘情况等一系列复杂的形态学特征已被用于一些海域蟹类蚤状幼体分类鉴定^[34-36]。由于海洋蟹类区系、种类繁多, 幼体变态复杂, 且大部分物种没有早期发育的形态记述, 目前在天然海域直接通过形态观察手段建立各个物种幼体的形态鉴定标准极为困难。线粒体 CO I 基因测序作为成熟的生物分子分类手段已广泛地应用于生物类群的辅助鉴定^[32]。本研究中, 笔者借助此方法准确地获得了研究海域梭子蟹科蚤状幼体的种类多样性特征, 经过比对分析, 建立了 3 种梭子蟹科蚤状幼体形态分类检索表。在研究早期阶段, 线粒体 CO I 基因测序可作为海洋蟹类等无脊椎动物幼体形态鉴定标准构建的有力辅助工具。通过分子生物学分类和形态学观察相结合, 逐步构建系统的中国海洋蟹类幼体形态分类记述及检索系统, 是未来蟹类早期生活史基础研究的重要方向。同时, 本研究采集 3 种梭子蟹类大眼幼体数量较少, 未能就大眼幼体阶段建立形态检索系统, 这可能与海洋蟹类幼体一般具有昼夜垂直迁移习性, 常常在夜间上浮到近表层, 白天则栖息于水体底部^[37], 常规的白天水平拖网调查难以采到样品有关。

参考文献:

- [1] Liu R Y. Checklist of marine biota of China seas[M]. Beijing: China Science Press, 2008: 1-5. [刘瑞玉. 中国海洋生物名录[M]. 北京: 科学出版社, 2008: 1-5.]
- [2] Sha Z L, Ren X Q, Wang Y L. Marine benthic crustacean from Jiaozhou Bay and Qingdao adjacent waters[M]. Beijing: China Science Press, 2017: 1-9. [沙忠利, 任先秋, 王永良. 胶州湾及青岛邻近海域底栖甲壳动物上册[M]. 北京: 科学出版社, 2017: 1-9.]
- [3] Sha Z L, Jiang W, Ren X Q, et al. Marine benthic crustacean from Jiaozhou Bay and Qingdao adjacent waters[M]. Beijing: China Science Press, 2018: 247-252. [沙忠利, 蒋维, 任先秋, 等. 胶州湾及青岛邻近海域底栖甲壳动物下册[M]. 北京: 科学出版社, 2018: 247-252.]
- [4] Chen D G. Fishery Resource Biology[M]. Beijing: China Agricultural Press, 1997: 20-24. [陈大刚. 渔业资源生物学[M]. 北京: 农业出版社, 1997: 20-24.]
- [5] Muzio G D, Sartor R M, Nurra N, et al. Morphology of planktonic zoeal stages of *Palicus caronii* (Decapoda, Brachyura), identified by DNA barcoding, provides novelties to *PaliCO Idea* larval systematics[J]. Scientific Reports, 2019, 9(1): 1-10.
- [6] Lira S M D A, Lima C D M D, Teixeira I D V, et al. The first zoeal stage of the yellow land crab *Johnngarthia lagostoma* (Milne Edwards, 1837) (Decapoda: Brachyura: Gecarcinidae)[J]. Zootaxa, 2021, 4990(1): 192-200.
- [7] Al-Aidaros A M, Kumar A A J, Al-Haj A E, et al. Morphology of the complete larval stages of *Portunus segnis* (Forskål, 1775) (Crustacea: Brachyura: Portunidae) from the Gulf of Aqaba, Saudi Arabia[J]. Zootaxa, 2019, 4638(2): 199-218.
- [8] Ayako O, Kayama W H, Susumu O, et al. Does the Kuroshio Current transport planktonic larvae of the hydrothermal-vent crab *Xenograpsus* Takeda & Kurata, 1977(Decapoda: Brachyura: Grapsoidea)[J]. Journal of Crustacean Biology, 2022, 42(1): 1-8.
- [9] Roegner G C, Armstrong D A, Hickry B M, et al. Ocean distribution of dungeness crab megalopae and recruitment patterns to estuaries in southern Washington State[J]. Estuaries, 2003, 26(4B): 1058-1070.
- [10] Sorochan K A, Quijón P A. Horizontal distributions of Dungeness crab (*Cancer magister*) and sed rock crab (*Cancer productus*) larvae in the Strait of Georgia, British Columbia[J]. ICES Journal of Marine Science, 2014, 71(9): 2564-2577.
- [11] Satterthwaite E V, Ryan J P, Harvey J B J, et al. Invertebrate larval distributions influenced by adult habitat distribution, larval behavior, and hydrodynamics in the retentive upwelling shadow of Monterey Bay, California, USA[J]. Marine Ecology Progress Series, 2021, 661: 35-47.
- [12] Hobbs R C, Botsford L W. Diel vertical migration and timing of metamorphosis of larvae of the Dungeness crab *Cancer magister*[J]. Marine Biology, 1992, 112: 417-428.
- [13] Ouellet P, Sainte-Marie B. Vertical distribution of snow crab (*Chionoecetes opilio*) pelagic stages in the Gulf of St. Lawrence (Canada) and effect of temperature on develop-

- pment and survival[J]. ICES Journal of Marine Science, 2018, 75(2): 773-784.
- [14] Lambert R, Epifanio C. A comparison of dispersal strategies in two genera of brachyuran crab in a secondary estuary[J]. Estuaries and Coasts, 1982, 5(3): 182-188.
- [15] Forward R B, JR. Larval biology of the crab *Rhithropanopeus harrisii* (Gould): A synthesis[J]. The Biological Bulletin, 2009, 216(3): 243-256.
- [16] Young C M. Behavior and locomotion during the dispersal phase of larval life[M]//Ecology of Marine Invertebrate Larvae. Boca Raton: CRC Marine Science Series Press, 1995: 249-277.
- [17] Gravinese P M, Enochs I C, Manzello D P, et al. Ocean acidification changes the vertical movement of stone crab larvae[J]. Biology Letters, 2019, 15(12), 20190414.
- [18] Png-Gonzalez L, Papiol V, Balbin R, et al. Larvae of the blue crab *Callinectes sapidus* Rathbun, 1896 (Decapoda: Brachyura: Portunidae) in the Balearic Archipelago (NW Mediterranean Sea)[J]. Marine Biodiversity Records, 2021, 14(1): 1-5.
- [19] Epifanio C E. Early life history of the blue crab *Callinectes sapidus*: a review[J]. Journal of Shellfish Research, 2019, 38(1): 1-22.
- [20] Forward R B, Reyns N B, Diaz H, et al. Endogenous swimming rhythms of juvenile blue crabs, *Callinectes sapidus*, as related to horizontal transport[J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2004, 299(1): 63-76.
- [21] Wang L Q. The complete larval development of *Helice tientsinensis* Rathbun[J]. Studia Marina Sinica, 2002, 44: 139-150. [王丽卿. 天津厚蟹的幼体发育[J]. 海洋科学集刊, 2002, 44: 139-150.]
- [22] Wang L Q, Chen Y J. The complete larval development of *Eriocheir leptognathus*[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2003, 27(5): 457-462. [王丽卿, 陈扬建. 狭额绒螯蟹的幼体发育[J]. 水生生物学报, 2003, 27(5): 457-462.]
- [23] Sun Y M, Yun Y, Sun J J. The larval development of *Portunus trituberculatus*[J]. Journal of Fisheries of China, 1984, 8(3): 219-226. [孙颖民, 闫愚, 孙进杰. 三疣梭子蟹的幼体发育[J]. 水产学报, 1984, 8(3): 219-226.]
- [24] Liao Y Y, Li G Q. Larval Rearing of *Portunus trituberculatus* in the South Sea of China[J]. Journal of Guangdong Ocean University, 2008, 28(3): 29-33. [廖永岩, 利光强. 南海海域三疣梭子蟹的幼体培育[J]. 广东海洋大学学报, 2008, 28(3): 29-33.]
- [25] Liao Y Y, Yu B, Dong X X. A research on the development of larvae of the *Portunus pelagicus*[J]. Journal of oceanography in taiwan strait, 2001, 20(4): 553-546. [廖永岩, 余波, 董学兴. 远海梭子蟹幼体发育的研究[J]. 台湾海峡, 2001, 20(4): 553-546.]
- [26] Huang S N, Li W L. A research on the development of larvae of the *Scylla serrata*[J]. Journal of Fisheries of China, 1965, 2(04): 24-34. [黄胜南, 李婉丽. 锯缘青蟹幼体发育的研究[J]. 水产学报, 1965, 2(4): 24-34.]
- [27] Wang H W, Yuan Z Z, Qi F, et al. Preliminary observations on the development of larval of *Orithya sinica*[J]. Journal of Dalian Ocean University, 2012, 27(3): 231-235. [王红伟, 原振政, 祁峰, 等. 中华虎头蟹幼体发育的初步观察[J]. 大连海洋大学学报, 2012, 27(3): 231-235.]
- [28] Yan Y, Sun Y M, Song Z L. The larval development of *Charybdis japonica* (A. Milne-Edwards)[J]. Journal of Fisheries of China, 1989, 13(1): 74-79. [阎愚, 孙颖民, 宋志乐. 日本蟳幼体发育的研究[J]. 水产学报, 1989, 13(1): 74-79.]
- [29] Zhi G, Guang P F, Feng Z, et al. Distribution of larval crabs (*Eriocheir sinensis*) and relationship with oceanographic features in the Yangtze Estuary[J]. Ecoscience, 2018, 25(2): 1-10.
- [30] Li C S, Yu L F, Dai G L, et al. Survey for megalopa of *Egicheir sinensis* and other species megalopa in the estuary of Changjiang river and adjacent waters[J]. Journal of Fisheries of China, 1997, 21: 111-114. [李长松, 俞连福, 戴国梁, 等. 长江口及其邻近水域中华绒螯蟹大眼幼体和其它蟹类大眼幼体的调查研究[J]. 水产学报, 1997, 21: 111-114.]
- [31] Zhu X M. Megalopae morphological differentiation of *Eriocheir sinensis* and some carbs of the family[J]. Journal of oceanography in taiwan strait, 1997, 16(4): 465-467. [朱小明. 中华绒螯蟹和同科几种大眼幼体的形态区别[J]. 台湾海峡, 1997, 16(4): 465-467.]
- [32] Folmer O, Black M, Wr H, et al. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome C oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates[J]. Molecular Marine Biology and Biotechnology, 1994, 3(5): 294-299.
- [33] Hwang S G, Kim C H. Complete larval development of the swimming crab, *Charybdis bimaculate* (Miers, 1886) (Crustacea, Brachyura, Portunidae) reared in laboratory[J]. Korean Journal of Zoology, 1995, 38: 465-482.
- [34] Paula, J. A key and bibliography for the identification of zoeal stages of brachyuran crabs (Crustacea, Decapoda, Brachyura) from the Atlantic coast of Europe[J]. Journal of Plankton Research, 1996, 18(1): 17-27.
- [35] Rice A, Tsukimura B. A Key to the Identification of brachyuran zoeae of the San Francisco Bay Estuary[J]. Journal of Crustacean Biology, 2007, 27(1): 74-79.
- [36] Bento M, Paula J. Keys and bibliography for the identification of zoeal stages of brachyuran crabs from the Western Indian Ocean[J]. Western Indian Ocean Marine Science Association, 2018, 17(1): 13-51.
- [37] Ye Z J, Peng Y Q, He T Q, et al. Diel vertical migration characteristics of crab larvae in the mixing tidal front waters in the Yellow Sea[J]. Periodical of Ocean University of China, 2022, 52(9): 35-42. [叶振江, 彭玉强, 何天庆, 等. 黄海近岸潮汐锋海域蟹类幼体日间垂直迁移特征[J]. 中国海洋大学学报, 2022, 52(9): 35-42.]

Zoea identification of three swimming crabs: *Portunus trituberculatus*, *Charybdis japonica*, and *Charybdis bimaculate* through morphological and mitochondrial CO I gene analyses

ZHANG Xingui¹, HE Tianqing¹, YE Zhenjiang¹, WANG Yihan¹, ZHANG Wenchao¹, XIONG Wenqing¹, QU Ningxin¹, JIANG Huidong¹, LU Zhiguang²

1. College of Fisheries, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

2. Rizhao Shanhaitian Tourism Resort Marine Development Bureau, Rizhao 276827, China

Abstract: Swimming marine crabs are an important fishing resource worldwide. Early life history is a key process for crab stock biomass variation and has great research necessity and importance for scientific management and protection of fisheries resources. Standards for zoea morphological identification are an important key base for studying crab early life history, and some studies have described the zoeal stages of swimming crabs from the Yellow Sea in recent decades. However, no studies have been conducted on key forms of identification of crab larvae in this area. Based on the ichthyoplankton field survey conducted along the Haizhou Bay and adjacent waters in the Yellow Sea from May to August in 2018, we explored the larvae identification method of three species of marine swimming crabs (Crustacea: Portunidae) through morphological and mitochondrial CO I gene analyses. More than 150 crab larvae were randomly selected, observed for morphological characteristics, and identified by mitochondrial CO I gene analysis. Altogether, three Portunidae species, *Portunus trituberculatus*, *Charybdis japonica*, and *Charybdis bimaculate*, were found among them, and the results indicated that dorsal spine morphology and the number of armatures of lateral telson forks could be used for key classification characteristics for these three crab zoeae. As a result, a key for the identification of zoeal stages of three Portunidae crabs was provided. Additionally, 80 individuals of *Portunus trituberculatus* zoeae (20 ind. for each stage), 24 individuals of *Portunus trituberculatus* zoeae (four ind. for each stage), and 70 individuals of *Portunus trituberculatus* zoeae (10 ind. for each stage) from the August cruise were morphologically identified and examined using the mitochondrial CO I gene analysis; the morphological identification accuracies were 93.75%, 100%, and 97.14% for these three species, respectively.

The study established a morphological identification standard for zoeae of the three Portunidae crabs and provided a base for their early life history research. The biodiversity samples for molecular sequencing analysis were collected from May to August, and no other Portunidae larvae species were found. Therefore, the morphological identification standard of Portunidae larvae could be employed in research of crab early life history in spring and summer in the coastal Yellow Sea. However, different Portunidae crabs may exist in other marine waters or seasons, and further crab larval morphological research should be done in the future. Meanwhile, 14 Portunidae megalops were identified based on mitochondrial CO I gene analysis in this study, but no systemic morphology study was conducted for them because of the lack of samples, which may be related to their nocturnal diel vertical migration behavior and the surface tows sampling method in day time.

The results help to promote the research of crab stock variation and the sustainable utilization of fisheries resources, and has important implications for exploring the early life history of crabs in this region.

Key words: Yellow Sea; portunidae; zoea; identification; morphology; mitochondrial CO I gene

Corresponding author: YE Zhenjiang. E-mail: yechen@ouc.edu.cn