

スジエビ *Palaemon paucidens* 種群における造雄腺ホルモン遺伝子の分化Nucleotide sequence divergence of the androgenic gland hormone gene in the common freshwater shrimp *Palaemon paucidens* species complex張 成年^{1,2*}・柳本 卓³Seinen Chow^{1,2*}, Takashi Yanagimoto³¹水産技術研究所, 神奈川県横浜市金沢区福浦 2-12-4²アクオス研究所, 東京都八王子市元八王子町 3-2153-79³水産資源研究所, 神奈川県横浜市金沢区福浦 2-12-4¹Fisheries Technology Institute, 2-12-4 Fukuura, Yokohama, Kanagawa 236-8648, Japan, ²Aquos Institute, 3-2153-79 Motohachioji, Hachioji, Tokyo 193-0826, Japan, ³Fisheries Resources Institute, 2-12-4 Fukuura, Yokohama, Kanagawa 236-8648, Japan.

*Corresponding author, e-mail: kaiyoeell@gmail.com

Abstract

The common freshwater shrimp *Palaemon paucidens* is recognized as a species complex comprising three genetically distinct types, referred to as A, B, and C. The B type is further subdivided into two subtypes, B-I and B-II, with B-I being described as the new species *P. septemtrionalis*. In this study, we designed a PCR primer pair based on the nucleotide sequence of the cDNA encoding the insulin-like androgenic gland hormone (IAG) of *P. paucidens*. PCR products were cloned and the nucleotide sequences from A, B (including both B-I and B-II subtypes), and C types were determined. The PCR products encompassed the entire exon 1, the complete intron 1, and partial exon 2. Phylogenetic analysis revealed two largely divergent clades, designated as IAG1 and IAG2 paralogs. Substantial nucleotide sequence differences were observed among the three types in IAG1 and between B and C types in IAG2. Notably, no IAG2 was detected in A type samples, and no apparent difference was observed between the B-I and B-II subtypes in either paralog.

Key words: IAG; *Palaemon paucidens*; three types; B-I and B-II subtypes; sequence divergence

緒言

極東に広く分布するスジエビ *Palaemon paucidens* は、外来種であるチュウゴクスジエビ *P. sinensis* を除けば日本の淡水域に生息する唯一のスジエビ属の種と考えられていたが、いくつかの隠蔽種で構成される種群であることがわかってきた。1980 から 1990 年代にアイソザイム分析や交配実験によって遺伝的に異なる 2 タイプ (A と B) が存在すること、タイプ間では生殖隔離が存在することが明らかにされた (Chow and Fujio 1985; Chow et al. 1988; Fidhiany et al. 1988, 1990)。その後、ミトコンドリアゲノムの 16S rDNA と核の 18S rDNA 分析によって A タイプが原記載の

スジエビであること、A と B タイプ間の遺伝的差異がさらに補強されたことだけでなく、奄美大島固有の C タイプの存在が明らかにされた (張ら 2018a, 2019; Chow et al. 2019; 武田・池田 2022, 2023)。16S rDNA において、これら 3 タイプ間の塩基置換率は 5.5–8.2 % にもなる (張ら 2018a, 2019; Katogi et al. 2019; 武田・池田 2022)。さらに B タイプは B-I と B-II の 2 系統に分けられ、B-I 系統は宮城県牡鹿半島以北、北海道、日本海側河川に分布する一方、B-II 系統は宮城県牡鹿半島以南の太平洋側河川に分布することが報告された (張ら 2018a, 2019; Chow et al. 2019; 武田・池田 2023)。B-I と B-II 間の 16S rDNA における塩基

置換率は 3.7–4.5 %であった (張ら 2018a; Chow et al. 2019; 武田・池田 2022)。さらに Katogi et al (2019) は宮城県気仙沼の河川で採取されたスジエビ標本を *P. septemtrionalis* として新種記載し、これは B-I 系統に該当するものと考えられた (張ら 2018a; Chow et al. 2019; 武田・池田 2023)。以上のように、スジエビ種群は少なくとも原記載の A タイプ、新種記載された *P. septemtrionalis*、B-II 系統そして C タイプで構成されていることになる。この種群構成は主にアイソザイム分析とミトコンドリア DNA 分析によるものであるが、B-I 系統と C タイプのアイソザイム分析は行われていない。また、18S rDNA 配列において A、B、C タイプ間の差異が示されているが、タイプ間の差異は 1–2 塩基とわずかであり、B-I と B-II 系統間には差異が無い (張ら 2018b; 武田・池田 2022)。

我々はスジエビ種群の遺伝的分化に関する研究をさらに進めるため、核 DNA マーカーの探索を行ってきた。その中でインスリン様造雄腺ホルモン (insulin-like androgenic gland hormone) (以下 IAG) 遺伝子についてパラログと推定される配列及びタイプ間の塩基配列差についていくつか知見を得たので報告する。

材料および方法

用いたスジエビ標本を Table 1 に示す。これらの標本は張ら (2018a,b) で使用されたものである。A タイプは東京都多摩川支流大栗川 (TOG) と滋賀県琵琶湖 (BIW)、B-I 系統 (*P. septemtrionalis*)

は北海道信砂川 (HNB) と秋田県比詰川 (AHR)、B-II 系統は千葉県長者川 (CH) と鹿児島県集川 (AT)、そして C タイプは鹿児島県奄美大島嘉徳川 (AM) からの各 1 個体である。Banzai et al. (2012) がテナガエビ科 3 種 (コンジテンテナガエビ *Macrobrachium lar*、スジエビ、イソスジエビ *Palaemon pacificus*) の IAG をコードする cDNA 配列を報告している。これら 3 種標本はネット通販で入手したものであり、産地は不明である。このうちスジエビの塩基配列からデザインしたプライマー (AG2FP3: 5'-GAAGTCTACAATCAAA TTAC-3' 及び AG3RP2: 5'-AAATGGACGCAAAG GTGGTC-3') を PCR 増幅に用いた。PCR の工程は、94 °C で 4 分の熱変性、30 サイクルの増幅反応 (94 °C で 30 秒の熱変性・58 °C で 30 秒のアニーリング・72 °C で 50 秒の伸長)、及び 72 °C で 7 分の伸長、より成る。増幅産物のクローニングと塩基配列解析は Chow et al. (2024) に従った。各個体ごとに 3 から 6 コロニーを分析した。配列間の塩基置換率 (K2P distance) の計算、進化モデルの選択と系統樹作成には MEGA6 (Tamura et al. 2013) を用いた。

結果

PCR 産物の全長配列を決定できたクローン数は BIW8 で 4、HNB4 で 3、AT10 で 2、AM1 で 2 であった。部分配列を決定できたクローン数は TOG1 で 1、AHR2 で 2、CH1 で 1 であった。各個体で分析したクローンのうち塩基置換が見ら

Table 1. Specimens of *Palaemon paucidens* and *P. septemtrionalis* (B-I) used in the present study. See 張ら(2018a) for detailed sampling location.

ID	Location	Prefecture	date	type	haplotype
BIWA8	Lake Biwa	Shiga	June 2017	A	JA1
TOG1	Ohguri River	Tokyo	July 2017	A	JA21
HNB4	Nobusha River	Hokkaido	June 2016	B-I	JB6
AHR2	Hizume River	Akita	August 2017	B-I	JB3
CH1	Choja River	Chiba	August 2017	B-II	JB11
AT10	Atsumari River	Kagoshima	November 2017	B-II	JB16
AM1	Katoku River	Kagoshima	July 2014	C	JA23

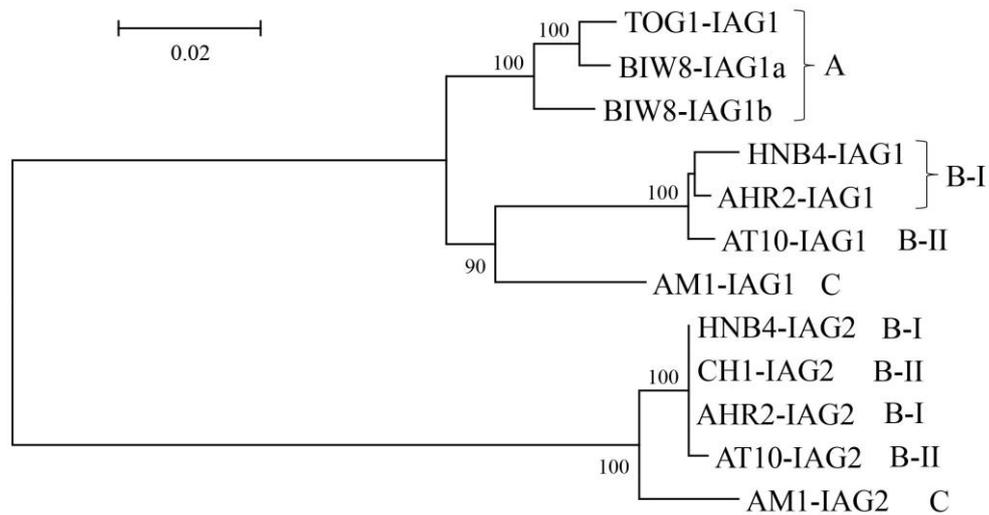


Fig. 1. Maximum likelihood phylogenetic tree based on TN93 as the best-fit model of 12 IAG gene sequences obtained from *Palaemon paucidens* and *P. septemtrionalis* (B-I).

れた 12 クローンの配列をデータベース (DNA Data Bank of Japan: DDBJ) に登録した (accession no. LC859057–LC859068)。全長を決定できた配列はプライマー部分を除くと 1,101–1,135 bp であった。これら 12 配列のアライメントを Appendix Fig. 1 に示す。Banzai et al. (2012) によるスジエビ IAG の cDNA 配列との比較により、本研究で全長を決定できた配列はエクソン 1 全長、イントロン 1 全長及びエクソン 2 の部分配列より構成されていることが示された。

12 配列を用いた系統樹を Fig. 1 に示した。配列は大きく 2 クレードに分けられ、これらを IAG のパラログと想定し、IAG1 及び IAG2 と定義し

た。IAG1 に属する配列と IAG2 に属する配列間の K2P は 17.8–21.4 %であった。IAG1 クレードでは 3 タイプが明瞭に分けられ、タイプ間の K2P は 4.8–6.3 %であった。B-I と B-II 系統間に大きな分化は見られず、配列間の K2P は 0.7–1.1 %であった。また、BIW8 から得た 2 クローン (BIW8-IAG1a と BIW8-IAG1b) 間の塩基置換数 (インデルを含む) は 21、K2P は 1.9 %であった。IAG2 クレードでは B-I と B-II 系統間に分化はほとんど無く、配列間の K2P は 0.0–0.3 %であった。B と C タイプ間には明瞭な差異が見られ、配列間の K2P は 1.9–2.4 %であった。A タイプからは IAG2 に該当する配列が得られなかった。

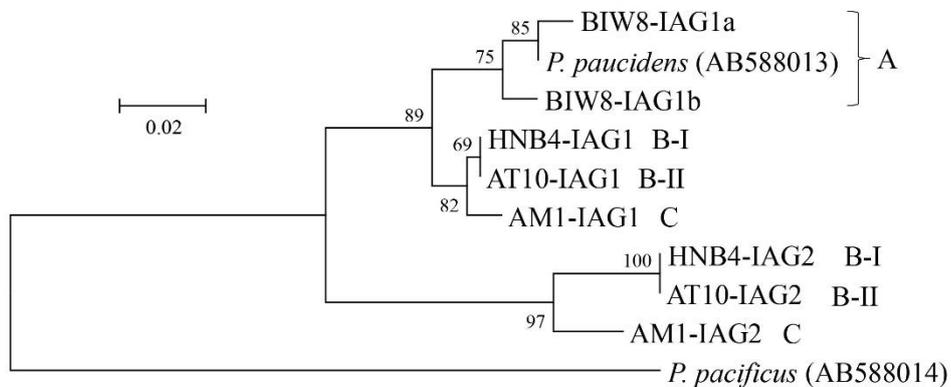


Fig. 2. Maximum likelihood phylogenetic tree based on JC as the best-fit model of eight exon sequences in IAG gene obtained from *Palaemon paucidens* and *P. septemtrionalis* (B-I), and corresponding cDNA regions of *P. paucidens* and *P. pacificus* reported by Banzai et al. (2012).

全長が決定できた 8 配列のエクソン領域 125 bp と Banzai et al. (2012) によるスジエビとイソスジエビの cDNA 配列を用いて系統樹を作成した (Fig. 2)。全長配列を用いた場合と同様に、スジエビの配列は IAG1 と IAG2 に該当する 2 クレードに分けられた。IAG1 クレードに属する配列と IAG2 クレードに属する配列間の K2P は 10.3–14.1% であった。Banzai et al. (2012) によるスジエビ cDNA は IAG1 クレードの A タイプに含まれ、BIW8-IAGa と BIW8-IAGb との K2P はそれぞれ 0.8 と 1.6% であった。BIW8-IAGa と BIW8-IAGb 間の K2P は 2.4% であった。IAG1 クレードでは A タイプと B+C タイプが明瞭に分けられ、これら配列間の K2P は 3.3–5.0% であった。B-I と B-II 系統間に差異は見られず、B と C タイ

プ間の K2P は 0.8% であった。IAG2 クレードでは B-I と B-II 系統間に分化は見られず、B と C タイプ間の K2P は 4.2% であった。イソスジエビ cDNA とスジエビ IAG1 及び IAG2 クレードに属する配列間の K2P は 25.5–27.9% であった。これらコーディング領域の演繹アミノ酸配列のアライメントとそれに基づく系統樹を Fig. 3 と Fig. 4 に示した。Ventura et al. (2011b) や Banzai et al. (2012) による種々の十脚類の IAG における演繹アミノ酸配列から、本研究で分析対象とした塩基配列から得た演繹アミノ酸配列は IAG のシグナルペプチド全領域と B 鎖の一部を含むことが示された (Fig. 3)。スジエビの演繹アミノ酸配列は IAG1 と IAG2 に該当する 2 クレードに分けられた (Fig. 4)。クレード間では 6–8 残基の差異が

	signal peptide← →B chain
BIW8-IAG1a	MAYRNISVK-VFFCMVMAFYLAQTASSYTIIECLSVDFDCGDM
BIW8-IAG1b-.....T.L.....P.....
<i>P. paucidens</i> *-.....P.....
HNB4-IAG1-.....L.....P....A.....
AT10-IAG1-.....L.....P....A.....
AM1-IAG1-.....L.....P....V.....
HNB4-IAG2	.V....GF.-....S.L.L....PS.....
AT10-IAG2	.V....GF.-....S.L.L....PS.....
AM1-IAG2	.H....GF.-....S.L.L....PS.....
<i>P. pacificus</i> *	..DW..G..N....VLL.LCWM.P....S....T..M....V

Fig. 3. Alignment of deduced amino acid sequences obtained from eight exon sequences in IAG gene of *Palaemon paucidens* and *P. septemtrionalis* (B-I) determined in the present study and those of *P. paucidens* and *P. pacificus* reported by Banzai et al. (2012) (asterisks). Amino acids identical with those of the top sequence are shown by dots and gap is shown by dash.

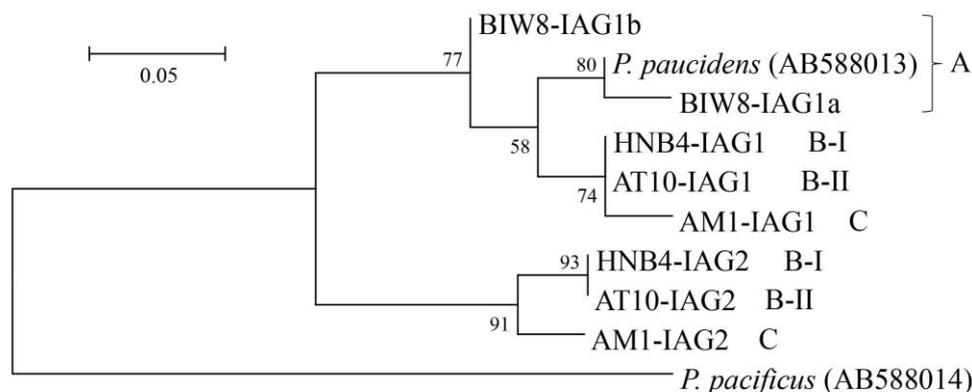


Fig. 4. Maximum likelihood phylogenetic tree based on JTT as the best-fit model of IAG amino acid sequences deduced from eight IAG gene sequences of *Palaemon paucidens* and *P. septemtrionalis* (B-I) determined in the present study and those of *P. paucidens* and *P. pacificus* reported by Banzai et al. (2012).

見られ、その多くがシグナルペプチド領域に見られた (Fig. 3)。IAG1 クレード内ではタイプを特徴づける明瞭な差異は無かった。IAG2 クレード内では B と C タイプ間で 2 残基差が見られた (Fig. 3)。スジエビとイソスジエビ間では 13–15 残基差が見られ、その多くはシグナルペプチド領域に見られた (Fig. 3)。

考察

甲殻類の性分化を制御する造雄腺 (androgenic gland) が端脚類のハマトビムシ *Orchestia gammarella* で発見されて以来 (Charniaux-Cotton 1954)、造雄腺と IAG に関する多くの研究が蓄積されてきた (例えば Levy et al. 2018)。十脚類ではザリガニの 1 種 *Cherax quadricarinatus* で IAG をコードする cDNA が Manor et al. (2007) によって初めて報告され、その後同様な研究がクルマエビ類 (Banzai et al. 2011; Li et al. 2012; Vázquez-Islas et al. 2014)、テナガエビ類 (Ventura et al. 2009, 2011a; Banzai et al. 2012; Ma et al. 2013, 2016; Li et al. 2015)、タラバエビ類 (Levy et al. 2020)、ザリガニ類 (Rosen et al., 2010; Savaya et al. 2020)、カニ類 (Chung et al. 2011; Huang et al. 2014, 2017; Jiang et al. 2020) で行われてきた。これらの研究は IAG をコードする遺伝子が 1 つであることを示唆している。

本研究で分析した琵琶湖産スジエビ A タイプ (BIW8) の IAG1 で検出された 2 種類のクローン (BIW8-IAG1a と BIW8-IAG1b) 間の塩基置換数は 21 であった。PCR 産物をクローニングした場合にはポリメラーゼによる複製エラーが顕在化することが指摘されている (Pääbo and Wilson 1988)。魚類と甲殻類において今回と同様な手法で約 1,000 bp の PCR 産物をクローニングした例では、最大で 5 塩基の複製エラーが観察されている (Chow et al. 2024)。琵琶湖産スジエビで検出された 2 種類のクローン間の差異はこのようなエラーの範囲を大きく超えていることから、異なる対立遺伝子あるいはパラログの可能性もある。

本研究でパラログの一つと想定した IAG1 では全塩基配列、エクソン領域及び演繹アミノ酸配列

の全てでスジエビ 3 タイプ間の明瞭な分化が示された。もう一つのパラログと想定した IAG2 は A タイプから検出されなかったが、B と C タイプ間では明瞭な分化が示された。これら IAG 遺伝子配列から導いたタイプ間の系統関係は B と C タイプが近縁であり、A タイプが最も分化していることを示す。これはミトコンドリア 16S rDNA の塩基配列から導かれた系統関係 (張ら 2018a; 武田・池田 2022, 2023) とよく一致する。B-I すなわち *P. septemtrionalis* と B-II 系統間の 16S rDNA 配列における塩基置換率は 3.7–4.5 % であり (張ら 2018a; Chow et al. 2019; 武田・池田 2022)、この値は 3 タイプ間の差に較べると小さいが、テナガエビ科の 16S rDNA で一般的に見られる種内塩基置換率 (0–2 %) (Murphy and Austin 2003; Murphy et al. 2004; Cartaxana 2015) を充分に超える。しかしながら、IAG1 と IAG2 とともに B-I と B-II 系統間に明瞭な分化は見られず、IAG 遺伝子では B-I と B-II 系統間の遺伝的分化を検討できないことが示された。

IAG2 が A タイプから検出されなかった要因として、使用したプライマーと A タイプの相同領域の配列間でのミスマッチが考えられ、IAG1 と IAG2 間で保存された配列を参考にしてデザインしたプライマーによる PCR を行う必要がある。一方、A タイプに IAG2 が存在しない可能性もある。エクソン配列及びアミノ酸配列から得られた系統樹は、スジエビの系統で IAG のパラログが生じたことを示す。また、B タイプ 4 個体で 8 クローン、C タイプ 1 個体で 2 クローンの配列が決定され、そのうち B タイプ 3 個体、C タイプ 1 個体で IAG1 と IAG2 の両方が検出されている。一方、A タイプでは 2 個体で 5 クローンの配列が決定されているにもかかわらず IAG2 が検出されていない。Banzai et al. (2012) が使用したスジエビは明らかに A タイプであったが、1 種類の cDNA しか検出されていない。A タイプに IAG2 が存在しないのであれば、A タイプと B+C タイプが分化後にパラログの生成に関与した遺伝子重複が B+C タイプの系統で起こった可能性が考えられる。IAG1 と IAG2 間の塩基置換を考慮した縮重

プライマーのデザイン及びそれを用いた cDNA 解析が望まれる。B と C タイプで検出された IAG2 が発現しているかどうか、発現しているならばその機能解析も今後の検討課題であろう。

謝辞

本研究で使用した北海道信砂川、秋田県比詰川、鹿児島県奄美大島嘉徳川の標本は丸山智朗氏(トレンドデザイン株式会社)、鹿児島県集川の標本は今井 正氏(水産研究・教育機構)、滋賀県琵琶湖の標本は池田 実氏(東北大学)によって採集されたものである。2名の査読者からは重要なお助言、ご指摘をいただいた。以上の方々に厚く御礼申し上げます。

引用文献

- Banzai, K., Ishizaka, N., Asahina, K., Suitoh, K., Izumi, S., Ohira, T. (2011). Molecular cloning of a cDNA encoding insulin-like androgenic gland factor from the kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus* and analysis of its expression. *Fish. Sci.* 77: 329–335.
- Banzai, K., Izumi, S., Ohira, T. (2012). Molecular cloning and expression analysis of cDNAs encoding an insulin-like androgenic gland factor from three palaemonid species, *Macrobrachium lar*, *Palaemon paucidens* and *P. pacificus*. *JARQ* 46: 105–114.
- Cartaxana, A. (2015). Morphometric and molecular analyses for populations of *Palaemon longirostris* and *Palaemon garciacidi* (Crustacea, Palaemonidae): Evidence for a single species. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 154: 194–204.
- Charniaux-Cotton, H. (1954). Découverte chez un Crustacé Amphipode (*Orchestia gammarella*) d'une glande endocrine responsable de la différentiation des caractères sexuels primaires et secondaires mâles. *C. R. Acad. Sci. Paris* 239: 780–782.
- Chow, S., Fujio, Y. (1985). Biochemical evidence of two types in the fresh water shrimp *Palaemon paucidens* inhabiting the same water system. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 51: 1451–1460.
- Chow, S., Nomura, T., Fujio, Y. (1988). Reproductive isolation and distinct population structure in two types of freshwater shrimp *Palaemon paucidens*. *Evolution* 42: 804–813.
- 張 成年・柳本 卓・丸山智朗・池田 実・松谷 紀明・大貫貴清・今井 正 (2018a). スジエビ *Palaemon paucidens* の遺伝的分化. *日本生物地理学会会報* 73: 1–16.
- 張 成年・今井 正・池田 実・槇 宗市郎・大貫貴清・武藤文人・野原健司・古澤千春・七里浩志・渾川直子他 (2018b). スジエビ *Palaemon paucidens* の 2 タイプを判別するための DNA マーカーおよび日本における 2 タイプの分布. *Nippon Suisan Gakkaishi* 84: 674–681.
- Chow, S., Yanagimoto, T., Konishi, K., Fransen, C. H. J. (2019). On the type specimens of the common freshwater shrimp *Palaemon paucidens* De Haan, 1844 collected by Von Siebold and deposited in Naturalis Biodiversity Center. *Aquat. Anim.* 2019: AA2019-7.
- 張 成年・柳本 卓・小西光一・市川 卓・小松典彦・丸山智朗・池田 実・野原健司・大貫貴清・今井 正 (2019). Genetic diversity in type B of *Palaemon paucidens*. *水生動物* 2019: AA2019-11.
- Chow, S., Yasuike, M., Yanagimoto, T. (2024). Re-evaluation of nuclear mitochondrial pseudogenes (NUMTs) and heteroplasmy in the Japanese spiny lobster *Panulirus japonicus*. *Crust. Res.* 53: 27–36.
- Chung, J. S., Manor, R., Sagi, A. (2011). Cloning of an insulin-like androgenic gland factor (IAG) from the blue crab, *Callinectes sapidus*: Implications for eyestalk regulation of IAG expression. *Gen. Comp. Endocrinol.* 173: 4–10.
- Fidhiany, L., Kijima, A., Fujio, Y. (1988). Genetic divergence between two types in *Palaemon paucidens*. *Tohoku J. Agricult. Res.* 39: 39–45.
- Fidhiany, L., Kijima, A., Fujio, Y. (1990). Premating and postmating isolation among local populations of freshwater shrimp *Palaemon paucidens* in Japan. *Nippon Suisan Gakkaishi* 56: 1407–1411.
- Huang, X., Ye, H., Huang, H., Yang, Y., Gong, J. (2014). An insulin-like androgenic gland hormone gene in the mud crab, *Scylla paramamosain*, extensively expressed and involved in the processes of growth and female reproduction. *Gen. Comp. Endocrinol.* 204: 229–238.
- Huang, X., Ye, H., Chung, J. S. (2017). The presence of an insulin-like androgenic gland factor (IAG) and insulin-like peptide binding protein (ILPBP) in the ovary of the blue crab, *Callinectes sapidus* and their roles in ovarian development. *Gen. Comp. Endocrinol.* 249: 64–70.
- Jiang, Q., Zheng, H., Zheng, L., Wang, Y., Wang, M., Xie, X., Zhu, D. (2020). Molecular characterization of the insulin-like androgenic gland hormone in the swimming crab, *Portunus trituberculatus*, and its involvement in the insulin signaling system. *Front. Endocrinol.* 11: 585.
- Katogi, Y., Chiba, S., Yokoyama, K., Hatakeyama, M., Shirai, S., Komai, T. (2019). A new freshwater

- shrimp species of the genus *Palaemon* Weber, 1795 (Decapoda: Caridea: Palaemonidae) from northeastern Japan. *Zootaxa* 4576: 239–256.
- Levy, T., Aflalo, E. D., Sagi, A. (2018). Sex control in cultured decapod crustaceans. In: H. Wang, et al. (Eds.) *Sex Control in Aquaculture*. John Wiley & Sons, NJ, p. 689–704.
- Levy, T., Tamone, S. L., Manor, R., Aflalo, E. D., Sklarz, M. Y., Chalifa-Caspi, V., Sagi, A. (2020). The IAG-switch and further transcriptomic insights into sexual differentiation of a protandric shrimp. *Front. Mar. Sci.* 7: 587454.
- Li, S., Li, F., Sun, Z., Xiang, J. (2012). Two spliced variants of insulin-like androgenic gland hormone gene in the Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 177: 246–255.
- Li, F., Bai, H., Xiong, Y., Fu, H., Jiang, S., Jiang, F., Jin, S., Sun, S., Qiao, H., Zhang, W. (2015). Molecular characterization of insulin-like androgenic gland hormone-binding protein gene from the oriental river prawn *Macrobrachium nipponense* and investigation of its transcriptional relationship with the insulin-like androgenic gland hormone gene. *Gen. Comp. Endocrinol.* 216: 152–160.
- Ma, K-Y., Lin, J-Y., Guo, S-Z., Chen, Y., Li, J-L., Qiu, G-F. (2013). Molecular characterization and expression analysis of an insulin-like gene from the androgenic gland of the oriental river prawn, *Macrobrachium nipponense*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 185: 90–96.
- Ma, K-Y., Li, J-L., Qiu, G-F. (2016). Identification of putative regulatory region of insulin-like androgenic gland hormone gene (IAG) in the prawn *Macrobrachium nipponense* and proteins that interact with IAG by using yeast two-hybrid system. *Gen. Comp. Endocrinol.* 229: 112–118.
- Manor, R., Weil, S., Oren, S., Glazer, L., Aflalo, E. D., Ventura, T., Chalifa-Caspi, V., Lapidot, M., Sagi, A. (2007). Insulin and gender: An insulin-like gene expressed exclusively in the androgenic gland of the male crayfish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 150: 326–336.
- Murphy, N. P., Austin, C. M. (2003). Molecular taxonomy and phylogenetics of some species of Australian palaemonid shrimps. *J. Crust. Biol.* 23: 169–177.
- Murphy, N. P., Short, J. W., Austin, C. M. (2004). Re-examination of the taxonomy of the *Macrobrachium australiense* Holthuis (Decapoda: Palaemonidae) species-complex: molecular evidence for a single species. *Inv. Syst.* 18: 227–232.
- Pääbo, S., Wilson, A. (1988). Polymerase chain reaction reveals cloning artefacts. *Nature* 334: 387–388.
- Rosen, O., Manor, R., Weil, S., Gafni, O., Linial, A., Aflalo, E. D., Ventura, T., Sagi, A. (2010). A sexual shift induced by silencing of a single insulin-like gene in crayfish: ovarian upregulation and testicular degeneration. *PLoS ONE* 5: e15281.
- Savaya, A., De Leo, G., Aalto, E., Levy, T., Rosen, O., Manor, R., Aflalo, E. D., Tricarico, E., Sagi, A. (2020). The IAG gene in the invasive crayfish *Procambarus clarkii*-towards sex manipulations for biocontrol and aquaculture. *Manag. Biol. Invasions* 11: 237–258.
- 武田真城・池田 実 (2022). 奄美大島と加計呂麻島におけるスジエビ *Palaemon paucidens* Cタイプの分布と遺伝的特徴ならびに幼生の海水要求性. *水生動物* 2022: AA2022-2.
- 武田真城・池田 実 (2023). 奄美大島固有のCタイプを含む「スジエビ」の3タイプについて. *うみうし通信* 120: 5–7.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipiński, A., Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30: 2725–2729.
- Vázquez-Islas, G., Garza-Torres, R., Guerrero-Tortolero, D., Campos-Ramos, R. (2014). Histology of the androgenic gland and expression of the insulin-like androgenic gland hormone precursor gene in the genital organ of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *J. Crust. Biol.* 34: 291–299.
- Ventura, T., Manor, R., Aflalo, E. D., Weil, S., Raviv, S., Glazer, L., Sagi, A. (2009). Temporal silencing of an androgenic gland-specific insulin-like gene affecting phenotypical gender differences and spermatogenesis. *Endocrinol.* 150: 1278–1286.
- Ventura, T., Manor, R., Aflalo, E. D., Weil, S., Khalaila, I., Rosen, O., Sagi, A. (2011a). Expression of an androgenic gland-specific insulin-like peptide during the course of prawn sexual and morphotypic differentiation. *ISRN Endocrinol.* 2011: 1–11.
- Ventura, T., Rosen, O., Sagi, A. (2011b). From the discovery of the crustacean androgenic gland to the insulin-like hormone in six decades. *Gen. Comp. Endocrinol.* 173: 381–388.

Received: 10 January 2025 | Accepted: 28 January 2025 | Published: 1 February 2025

480

BIW8-IAG1a TTTTATTGAATTGAAGAA-----TTAAAGTAAAAA-TATATATCCAT-CAGGTTGCAT
 BIW8-IAG1bG-
 TOG1-IAG1G-
 HNB4-IAG1 .A.....A.C-
 AHR2-IAG1 .A.....A-
 AT10-IAG1 .A.....A-
 AM1-IAG1-T
 HNB4-IAG2 .A..T..AG.....G.AAAGCATTCAAATGGAGAGTGACTAGT.....C.....A.G.....A...C.....
 AHR2-IAG2 .A..T..AG.....G.AAAGCATTCAAATGGAGAGTGACTAGT.....C.....A.G.....A...C.....
 CH1-IAG2 .A..T..AG.....G.AAAGCATTCAAATGGAGAGTGACTAGT.....C.....A.G.....A...C.....
 AT10-IAG2 .A..T..AG.....G.AAAGCATTCAAATGGAGAGTGACTAGT.....C.....A.G.....A...C.....
 AM1-IAG2 .A..T..AG.....G.AAAGCATTCAAATGGAGAGTGACTAGT.....C.....G.....A...C.....

560

BIW8-IAG1a TGTGTCTATACTGCTTGAATTATATTCATGAATTGAGTCATAAGGGATGGCACTGTTGCTTTGGAGACCATTCAACTC
 BIW8-IAG1bT.....
 TOG1-IAG1C.....
 HNB4-IAG1C.....AT.....A.....
 AHR2-IAG1C.....AT.....A.....
 AT10-IAG1C.....AT.....A.....
 AM1-IAG1C.....AT.....A.....T.....A.....
 HNB4-IAG2G.....C.....GA.
 AHR2-IAG2G.....C.....GA.
 CH1-IAG2G.....C.....GA.
 AT10-IAG2G.....C.....GA.
 AM1-IAG2G.....C.....GA.

640

BIW8-IAG1a ACATATGCAACCAGGGGAAAATACC-GCATTATGAGGCGTAAGTTAAGAAATTGGACAGGAAGAGAGATGAAAGGAAGTA
 BIW8-IAG1bGA.....-
 TOG1-IAG1G.....-
 HNB4-IAG1G.....C.....A.G.....G...
 AHR2-IAG1G.....C.....G.....G...
 AT10-IAG1G.....C.....G.....G...
 AM1-IAG1G.....C.....C.....G.A..
 HNB4-IAG2G.....G.....GA.....CC.....C.A.....TG.....T.....
 AHR2-IAG2G.....G.....GA.....CC.....C.A.....TG.....T.....
 CH1-IAG2G.....G.....GA.....CC.....C.A.....TG.....T.....
 AT10-IAG2G.....G.....GA.....CC.....C.A.....TG.....T.....
 AM1-IAG2G.....G.....GA.....CC.....C.A.....TG.....T.....

720

BIW8-IAG1a GGAACAGTGGTAAAGTAGAAGGCTAAGAAGTAAGTTCAGATAGAGACCGAAAAGACATTGCAGATATTCTTAAGTAAAGC
 BIW8-IAG1b
 TOG1-IAG1
 HNB4-IAG1G.....C.....
 AHR2-IAG1G.....G.....
 AT10-IAG1G.....G.....C.....
 AM1-IAG1T.....G.....
 HNB4-IAG2G.....C.....G.AC.AGAG.T.G.....A.C.....
 AHR2-IAG2G.....C.....G.AC.AGAG.T.G.....A.C.....
 CH1-IAG2G.....C.....G.AC.AGAG.T.G.....A.C.....
 AT10-IAG2G.....C.....G.AC.AGAG.T.G.....A.C.....
 AM1-IAG2G.....C.....C.AGA.AC.AGAG.T.G.....A.C.....

800

BIW8-IAG1a CAACAAGGCTTTGTGGGGTGCGAGTAACGACGCTATTCTCATATGAGGCTTTTTT-AATATTTCTGTGCTCAATTAATGA
 BIW8-IAG1bC.....G.....
 TOG1-IAG1G.....
 HNB4-IAG1T.....T.....G.....
 AHR2-IAG1T.....A.....G.....
 AT10-IAG1T.....T.....A.....G.....
 AM1-IAG1T.....A.....
 HNB4-IAG2T..G.....A.A..T.G..T.....A.....TAA.---G.....
 AHR2-IAG2T..G.....A.A..T.G..T.....A.....TAA.---G.....
 CH1-IAG2T..G.....A.A..T.G..T.....A.....TAA.---G.....
 AT10-IAG2T..G.....A.A..T.G..T.....A.....TAA.---G.....
 AM1-IAG2T..G.....A.A..A.T.G..T.....A.C.....TAA.---G..A..

Appendix Fig. 1. continued

880

BIW8-IAG1a AATATGGTTAGAAAGGATAAGCCTATTAAGATGAAAGTTTCTAGATGAAGTTGCGTTAGTCAGTGACTGTAA-GGAGAA
 BIW8-IAG1bG.....C.....T-.....
 TOG1-IAG1-.....
 HNB4-IAG1T.....G..A.....T.....T...T.....A.....-.....T
 AHR2-IAG1G..A.....T.....T...T.....A.....-.....
 AT10-IAG1G..A.....T.....T...T.....A.....-.....
 AM1-IAG1G..A.....T.....T...T.....A.....-.....
 HNB4-IAG2G...C...G...GG.G.A...GG...T...CT...T.C.A...T...A.C.A...G
 AHR2-IAG2G...C...G...GG.G.A...GG...T...CT...T.C.A...T...A.C.A...G
 CH1-IAG2G...C...G...GG.G.A...GG...T...CT...T.C.A...T...A.C.A...G
 AT10-IAG2G...C...GA...GG.G.A...CGG...T...CT...T.C.A...T...A.C.A...G
 AM1-IAG2G...C...G...GG.G.A...GG...CT...TT.C.A...T...A.C.A...G

960

BIW8-IAG1a GCTGCAGACTGGTCAAAGGAGTCAAACATATTTGTAAGAA-AGACAGTAAAGAAATAGGAGTAAGTTCAAGGAGGTGAAA
 BIW8-IAG1b-.....G.....
 TOG1-IAG1-.....
 HNB4-IAG1A.....A.....-.....G.....
 AHR2-IAG1A.....A.....-.....G.....
 AT10-IAG1A.....A.....-.....G.....
 AM1-IAG1A.....A.....A.....G.....
 HNB4-IAG2C.....G...A...G..A...T..G...G.....T.....T..T...GA.....
 AHR2-IAG2C.....G...A...G..A...T..G...G.....T.....T..T...GA.....
 CH1-IAG2C.....G...A...G..A...T..G...G.....T.....T..T...GA.....
 AT10-IAG2C.....G...A...G..A...T..G...G.....T.....T..T...GA.....
 AM1-IAG2C.....G...A...TG..A...T..G...G.....T.....T..T...GC.....

1040

BIW8-IAG1a TCGAACTGTGGTTATTGTAAGTCAGGATTCATGTCTTTTCATTAGTCTACGTTTAGGCTGATCTTACGTCCATATTGAA
 BIW8-IAG1b ..T.....C.....
 TOG1-IAG1C.....
 HNB4-IAG1A.....A.....G.....
 AHR2-IAG1A.....C.....A.....G.....
 AT10-IAG1A.....A.....G.....
 AM1-IAG1A...G.....A.....
 HNB4-IAG2C.....A..AA.....A..T.....
 AHR2-IAG2C.....A..AA.....A..T.....
 CH1-IAG2C.....A..AA.....A..T.....
 AT10-IAG2C.....AA..AA.....A..T.....
 AM1-IAG2C.....A..A.....C..A..T.....T.....

1120

-exon 2

BIW8-IAG1a ATGTTATCTTTACAAAGCATTACTCCATTTCATTTCCGAAGGTGTTCTTTTGTATGGTGTGGCATTCTACTTGGCACAAA
 BIW8-IAG1bG.....C...T.....C
 TOG1-IAG1XX
 HNB4-IAG1G.....T.....G...C
 AHR2-IAG1G.....XX
 AT10-IAG1G.....T.....G...C
 AM1-IAG1G...T.....T.....G...C
 HNB4-IAG2G--...T...TC...T...G...C
 AHR2-IAG2G--...XX
 CH1-IAG2G--...XX
 AT10-IAG2G--...T...TC...T...G...C
 AM1-IAG2G--...T...TC...T...G...C

1178

BIW8-IAG1a CTGCTTCCAGTTATACGATTGAATGTCTTTCCGTTGATTTTGACTGTGGCGATATGAC
 BIW8-IAG1b
 TOG1-IAG1XX
 HNB4-IAG1CG.....
 AHR2-IAG1XX
 AT10-IAG1CG.....
 AM1-IAG1CGT.....
 HNB4-IAG2T.....C..A.....T.....T.....
 AHR2-IAG2XX
 CH1-IAG2XX
 AT10-IAG2T.....C..A.....T.....T.....
 AM1-IAG2T.....C.....T.....

Appendix Fig. 1. continued