

## 2种大眼蟹线粒体 COI 基因序列的比较研究

徐敬明

(重庆文理学院生命科学与技术学院, 重庆 永川 402168)

**摘要:**测定了宽身大眼蟹(*Macrophthalmus dilatatum*)和日本大眼蟹(*M. japonicus*)线粒体细胞色素氧化酶 I 亚基(COI)基因片段的序列,其长度均为 658bp, A、T、G、C 的含量宽身大眼蟹为 27.4%、30.9%、17.3%、24.4%,日本大眼蟹为 25.8%、32.0%、17.4%、24.7%。宽身大眼蟹只有 1 种单倍型,日本大眼蟹出现 2 种单倍型,2 种间有 123(124)个变异位点,核苷酸差异率为 18.69%(18.85%),其中转换 68(69)处,颠换 55(55)处,转换与颠换比约为 1.2(1.3);种间差异远大于种内个体间差异(0.61%)。2 种大眼蟹的 AT(57.9%)含量明显高于 GC 含量,与其他蟹类 COI 基因研究结果相似。系统发生树的拓扑结构支持大眼蟹科与弓蟹科亲缘关系相对较近,二者为姊妹群关系。

**关键词:**宽身大眼蟹;日本大眼蟹;COI;序列

**中图分类号:**Q178.53 **文献标志码:**A **文章编号:**1674-3075(2010)02-0042-06

宽身大眼蟹(*Macrophthalmus dilatatum*)和日本大眼蟹(*M. japonicus*)隶属于甲壳纲(Crustacea)、十足目(Decapoda)、沙蟹科(Ocypodidae)、大眼蟹亚科(Macrophthalminae)、大眼蟹属(*Macrophthalmus*),其中,前者穴居于近海或河口处的泥滩,后者穴居于近海潮间带或河口处的泥沙滩,数量较多,是制作蟹酥、蟹酱的原料,具有一定的经济价值;因宽身大眼蟹口前板中部突出、日本大眼蟹口前板中部具有明显凹陷,而将二者分属于大眼蟹亚属(*Macrophthalmus*)和乌食亚属(*Mareotis*) (戴爱云等,1986)。近来,一些学者根据分子系统学的研究而将沙蟹科的大眼蟹亚科等 4 个亚科分别提升为科,即 Dotillidae、Heloeciidae、Macrophthalmidae 和 Ocypodidae (Schubart et al, 2002; Kitaura et al, 2002)。

动物线粒体 DNA(mtDNA)因其分子量小、母系遗传、比核 DNA 进化速率快等特征而成为广泛应用于动物起源进化、群体遗传分化及系统发育研究的理想材料;而线粒体细胞色素氧化酶 I 亚基(COI)基因为线粒体基因组中变异性较大的区域,适合于进行种间及种内的分子系统学研究(夏得全等,1998;徐敬明,2006)。COI 基因序列用于蟹类的分子系统学研究较多(孔晓瑜等,2001;郭天慧等,2004;徐敬明等,2007;林琪等,2008; Tam et al, 1996; Schubart et al, 1998; Tang et al, 2003; Harrison

et al, 2004; Pfeiler et al, 2005; Shih et al, 2008),但关于大眼蟹 COI 基因的研究尚未见报道。

本研究对产于中国的 2 种大眼蟹的线粒体 COI 基因进行了序列测定和分析,结合从 GenBank 下载的有关蟹类的基因序列,进行分子系统关系分析,探讨大眼蟹等蟹类之间的遗传差异及亲缘关系,以期为蟹类的种质鉴定、物种保护和资源评价提供基础资料,为进一步研究蟹类分子系统学提供依据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验材料

实验用 2 种大眼蟹即宽身大眼蟹和日本大眼蟹于 2006 年 7 月采于辽宁省大连沿海潮间带泥滩,浸制于 95% 的乙醇中保存备用。每种取 2 个个体用于序列分析。

#### 1.2 DNA 提取

从宽身大眼蟹和日本大眼蟹的步足和螯足中取约 50 mg 肌肉,采用传统法(酚/氯仿抽提法)从肌肉组织中提取基因组 DNA。将乙醇沉淀后 DNA 溶解入 40  $\mu$ L 超纯水,放入 4 $^{\circ}$ C 冰箱 6 h,于 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

#### 1.3 PCR 扩增

用于扩增 COI 基因片段的 2 个引物的正向和反向核苷酸序列为(Folmer et al, 1994):

COI1490:5' - GGTCACAAATCATAAAGATA  
TTGG - 3'

COI2198:5' - TAAACTTCAGGCTGACCAAAA  
AATCA - 3'

收稿日期:2009-06-07

基金项目:重庆文理学院引进人才专项。

作者简介:徐敬明,1963 生,男,山东日照人,教授,博士,主要从事动物分子与生理生态研究。E-mail: xjingming@163.com

PCR扩增时的反应体积为25  $\mu$ L, 反应液中含2.5  $\mu$ L 10  $\times$  PCR buffer, 2.0  $\mu$ L dNTPs(2.5 mM), 2.0  $\mu$ L MgCl<sub>2</sub>(25 mM), 1  $\mu$ L 模板DNA, 引物各0.5  $\mu$ L(10  $\mu$ M), 0.2  $\mu$ L Taq 酶(5 U/ $\mu$ L), 无菌去离子水补足到25  $\mu$ L。

COI 基因片段 PCR 循环参数为:94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min 后, 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 47  $^{\circ}$ C 退火 50 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 循环 35 次, 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min, 于 4 $^{\circ}$ C 保存。

#### 1.4 序列测定

PCR 产物用含有溴化乙锭的 1.0 % 琼脂糖凝胶电泳检测, 凝胶成像系统观察、照相。对于扩增效果良好的样品进行回收, 回收时用 1.0 % 琼脂糖凝胶, TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit(宝生物工程大连有限公司)进行回收和纯化, 纯化产物送至上海英骏测序公司, 用 ABI3730XL 测序仪进行正反链双向测序, 所用引物和 PCR 扩增时的相同。

#### 1.5 数据分析

经仔细核对测序胶图后的正反向序列, 均由 DNASTAR 软件包(DNASTAR, Inc., Madison, USA)

进行编辑、校对和比对, 并对排序结果进行分析; 所有序列为两端去引物后的序列。用 MEGA (Version4.0) 软件统计序列的碱基组成, 基于 Kimura - 双参数距离模型估计遗传距离, 进行系统发生和分子进化分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 基因序列比较

宽身大眼蟹和日本大眼蟹 COI 基因片段序列长度均为 658bp。其中, 日本大眼蟹 2 个个体出现了 2 种单倍型, 二者在序列的 154(T/C)、238(A/G)、466(A/G)和 481(A/G)位点上发生了均为转换的变异, 核苷酸差异率为 0.61%; 宽身大眼蟹 2 个个体序列相同, 其与日本大眼蟹单倍型 1 之间存在 123 处变异, 其中转换 68 处, 颠换 55 处, 转换与颠换比约为 1.2, 核苷酸差异率为 18.69%; 而与日本大眼蟹单倍型 2 之间存在 124 处变异, 其中转换 69 处, 颠换 55 处, 转换与颠换比约为 1.3, 核苷酸差异率为 18.85%, 均无插入/缺失位点(图 1)。

<i>M. dilatatum</i>	A	ACA	CTA	TAC	TTC	GTT	TTT	GCC	GCT	TGA	GCT	GGT	ATA	GTT	GGA	ACT	TCT	CTC	AGA	CTT	AT	[ 60]
<i>M. japonicus</i> haplotype1	.	. . . C	T.G	. . . . .	. . . . .	A.C	. . . C	. . . A	. . . . .	. . . . .	. . . C	. . . A	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . C	T.A	. . . T.A	. . . [ 60]
<i>M. japonicus</i> haplotype2	.	. . . C	T.G	. . . . .	. . . . .	A.C	. . . C	. . . A	. . . . .	. . . . .	. . . C	. . . A	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . C	T.A	. . . T.A	. . . [ 60]
<i>M. dilatatum</i>	T	ATC	CGA	GCC	GAA	CTT	AGA	CAA	CCA	AGA	AGT	CTC	ATC	GGA	AAC	GAC	CAA	ATT	TAC	AAT	GT	[120]
<i>M. japonicus</i> haplotype1	.	. . T	. . G	. . . . .	. . . . .	T.A	. . T	. . G	. . C	. . . . .	. . . A	. . T	. . T	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . C	. . [120]
<i>M. japonicus</i> haplotype2	.	. . T	. . G	. . . . .	. . . . .	T.A	. . T	. . G	. . C	. . . . .	. . . A	. . T	. . T	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . C	. . [120]
<i>M. dilatatum</i>	A	GTA	GTT	ACA	GCT	CAC	GCT	TTC	GTT	ATA	ATT	TTC	TTC	ATA	GTT	ATG	OCA	GTG	ATG	ATT	GG	[180]
<i>M. japonicus</i> haplotype1	.	. . C	. . A	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	[180]
<i>M. japonicus</i> haplotype2	.	. . C	. . A	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	[180]
<i>M. dilatatum</i>	G	GCC	TTC	GGA	AAC	TGA	TTA	GTC	CCC	CTT	ATA	TTA	GGA	GCC	OCA	GAT	ATA	GCT	TTT	CCC	CG	[240]
<i>M. japonicus</i> haplotype1	A	. . A	. . T	. . T	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	[240]
<i>M. japonicus</i> haplotype2	A	. . A	. . T	. . T	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	[240]
<i>M. dilatatum</i>	T	ATA	AAT	AAC	ATA	AGA	TTT	TGA	TTA	CTC	CCA	CCA	TCT	CTC	ACT	TTA	TTA	CTT	TCA	AGG	AG	[300]
<i>M. japonicus</i> haplotype1	.	. . . . .	. . C	. . T	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	[300]
<i>M. japonicus</i> haplotype2	.	. . . . .	. . C	. . T	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	[300]
<i>M. dilatatum</i>	A	ATA	GTA	GAA	AGA	GGG	GTA	GGA	ACA	GGA	TGA	ACC	GTT	TAT	OCT	OCT	CTA	GCC	TCT	GCT	AT	[360]
<i>M. japonicus</i> haplotype1	.	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	[360]
<i>M. japonicus</i> haplotype2	.	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	[360]
<i>M. dilatatum</i>	T	GCT	CAC	GCA	GGT	GCT	TOC	GTT	GAC	CTA	GGT	ATT	TTC	TOC	CTC	CAT	CTC	GCA	GGG	GTA	TC	[420]
<i>M. japonicus</i> haplotype1	.	. . . . .	. . T	. . C	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	[420]
<i>M. japonicus</i> haplotype2	.	. . . . .	. . T	. . C	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	[420]
<i>M. dilatatum</i>	A	TCT	ATC	CTG	GGA	GCC	GTA	AAT	TTC	ATA	ACA	ACA	ATT	ATC	AAC	ATA	CGA	CCC	TOC	GGA	AT	[480]
<i>M. japonicus</i> haplotype1	C	. . . . .	. . T	. . C	. . G	. . T	. . T	. . C	. . T	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	[480]
<i>M. japonicus</i> haplotype2	C	. . . . .	. . T	. . C	. . G	. . T	. . T	. . C	. . T	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	[480]
<i>M. dilatatum</i>	A	ACT	ATA	GAC	CAA	ATA	CCA	TTA	TTT	GTA	TGA	GCT	GTA	TTT	ATT	ACT	GCA	ATC	CTG	CTC	CT	[540]
<i>M. japonicus</i> haplotype1	.	T. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	[540]
<i>M. japonicus</i> haplotype2	G	T. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	[540]
<i>M. dilatatum</i>	T	CTA	TCT	CTA	CCC	GTT	TTA	GCT	GGA	GCA	ATT	ACC	ATA	CTA	CTT	ACA	GAT	CGA	AAC	TTA	AA	[600]
<i>M. japonicus</i> haplotype1	.	. . C	. . C	. . C	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	[600]
<i>M. japonicus</i> haplotype2	.	. . C	. . C	. . C	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	[600]
<i>M. dilatatum</i>	T	ACC	TOC	TTC	TTT	GAC	OCT	GCA	GGA	GGA	GGG	GAC	CCA	ATC	CTG	TAC	CAA	CAC	CTA	TTT		[658]
<i>M. japonicus</i> haplotype1	C	. . . . .	. . T	. . T	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	[658]
<i>M. japonicus</i> haplotype2	C	. . . . .	. . T	. . T	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	[658]

图 1 宽身大眼蟹和日本大眼蟹 COI 基因片段序列比较

Fig. 1 Sequence comparison of the COI gene fragment between *M. dilatatum* and *M. japonicus*

## 2.2 遗传距离

日本大眼蟹 2 个单倍型之间的遗传距离为 0.006, 而宽身大眼蟹与前者单倍型 1 和单倍型 2 之间的遗传距离分别为 0.217 和 0.219。可见种间差异远大于种内差异, 同时这种差异也明显高于二者在 12S rRNA 和 16S rRNA 基因的差异(核苷酸差异率分别为 13.18% 和 12.26%, 另文发表), 表明 COI 基因的变异性大于 12S rRNA 和 16S rRNA(其 3 个个体的 12S rRNA 和 16S rRNA 基因片段序列相同, 不存在种内变异), 也表明 COI 基因序列的系统学解析能力较强, 更适合于种间、种内的系统研究, 而 COI 基因作为变异性较大的区域, 可提供更为丰富的 DNA 多态信息。

## 2.3 分类建议

2 种大眼蟹 COI 基因 18.69% 或 18.85% 的种间差异明显高于红螯相手蟹和褶痕相手蟹的 COI 基因的差异(11.40%)(徐敬明等, 2007), 而红螯相手蟹和褶痕相手蟹分属于 *Chiromantes* 和 *Parasesarma* 2 个属, 鉴于宽身大眼蟹和日本大眼蟹间的差异更大, 建议将日本大眼蟹从 *Macrophthalmus* 属中独

立出来, 将其亚属 *Mareotis* 提升为属; 这也与二者在形态上差异较大分属于 *Macrophthalmus* 和 *Mareotis* 2 个亚属相符合, 如宽身大眼蟹口前板中部突出、头胸甲的宽度约当其长度的 2.5 倍、雄螯两指间空隙很大, 而日本大眼蟹口前板中部具有明显凹陷、头胸甲的宽度仅为其长度的 1.5 倍、雄螯两指间无空隙(戴爱云等, 1986)。同时, 也得到了宽身大眼蟹和日本大眼蟹 12S rRNA (13.18%) 和 16S rRNA (12.26%) 基因差异较大的支持。

## 2.4 氨基酸序列

658bp 的核苷酸序列共编码 219 个氨基酸(图 2), 上述碱基替换的位置大都发生在密码子的第 3 位上, 如宽身大眼蟹与日本大眼蟹单倍型 1(2) 之间存在的 123(124) 处变异, 其中就有 54(55) 处转换和 51(51) 处颠换发生在密码子的第 3 位上。

密码子中, A、T、G、C 在 1、2、3 位点的平均含量差别很大, 其中 G 的平均含量变化最大, 第 1、2、3 位点 G 的平均含量分别是 30.1%、17.2% 和 5.2%, 这表明密码子的碱基使用频率存在明显的偏向性。

<i>M. dilatatum</i>	TLYFVFGAWA GMVGTSLSLI IRAELSQPSS LIGNDQIYNV VVTAHAFVMI FFMVMPVMIG	[ 60]
<i>M. japonicus</i> haplotypel	....I.....	[ 60]
<i>M. japonicus</i> haplotypel2	....I.....	[ 60]
<i>M. dilatatum</i>	GFGNWLVPLM LGAPDMAFPR MNNMSFWLLP PSLTLLLSSS MVESGVGTGW TVYPLASAI	[120]
<i>M. japonicus</i> haplotypel	.....	[120]
<i>M. japonicus</i> haplotypel2	.....	[120]
<i>M. dilatatum</i>	AHAGASVDLG IFSLHLGVS SILGAVNFMT TIINMRPSGM TMDQMPLFWV AVFITAILLL	[180]
<i>M. japonicus</i> haplotypel	.....A. S.....	[180]
<i>M. japonicus</i> haplotypel2	.....A. S.....	[180]
<i>M. dilatatum</i>	LSPVLAAGAI TMLLTRNLN TSFFDPAGGG DPILYQHLF	[219]
<i>M. japonicus</i> haplotypel	.....	[219]
<i>M. japonicus</i> haplotypel2	.....	[219]

图 2 宽身大眼蟹和日本大眼蟹 COI 基因扩增片段编码的肽链氨基酸序列

Fig. 2 Amino acid sequence coded by the amplified COI gene fragment of *M. dilatatum* and *M. japonicus*

由于密码子有兼并现象, 宽身大眼蟹和日本大眼蟹尽管在 123(124) 个位点上存在差异, 但在扩增 COI 基因片段编码的肽链 219 个氨基酸序列上却仅有 3 个氨基酸的变化, 即第 5、158、161 个氨基酸在宽身大眼蟹分别为缬氨酸(V)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T), 而在日本大眼蟹则分别为异亮氨酸(I)、丙氨酸(A)、丝氨酸(S)(图 2)。在所测定的序列中, GGA(甘氨酸, G)、AUA(蛋氨酸, M)、AUU(异亮氨酸, I)和 GCU(丙氨酸, A)的平均使用频率最高, 均达到 10 次以上, AGG(丝氨酸, S)和 CCG(脯氨酸, P)只出现 1 次, 除几种密码子没有被使用外, 其它使用次数一般在 3~8 次。2 种蟹类同义密码子使

用偏向性高度一致, 如在宽身大眼蟹 / 日本大眼蟹单倍型 1 / 日本大眼蟹单倍型 2 序列中 AUA(M)、AUU(I)、GGA(G)的使用次数分别是 14/14/12、9/13/13、11/15/15。这表明亲缘关系较近的同类物种具有相近的密码子用法。

## 2.5 基因片段序列组成

在碱基组成上, 宽身大眼蟹的 A、T、G、C 比例分别为 27.4%、30.9%、17.3%、24.4%, 而日本大眼蟹 2 个单倍型的 A、T、G、C 平均比例分别为 25.8%、32.0%、17.4%、24.7%(表 1)。可以看出, 宽身大眼蟹和日本大眼蟹的 A、T、G、C 含量差异都很小, 并且 AT 比例(57.4%~58.3%)明显高于 GC

含量,这与其它蟹类的COI基因序列的研究结果是一致的(徐敬明等,2007;林琪等,2008;Shih et al, 2008)。

表1 2种大眼蟹COI基因片段序列基本组成

Tab.1 Base composition of COI gene segment for two macrophthalmid crabs species

种类	比例/%					片段长/bp
	A	T	G	C	A+T	
<i>Macrophthalmus dilatatum</i>	27.4	30.9	17.3	24.4	58.3	658
<i>M. japonicus haplotype1</i>	26.0	32.1	17.3	24.6	58.1	658
<i>M. japonicus haplotype2</i>	25.5	31.9	17.8	24.8	57.4	658
平均	26.3	31.6	17.5	24.6	57.9	

## 2.6 系统发生树

从GenBank下载侧足厚蟹(*Helice latimera*, GenBank号:AB334545)、三齿厚蟹(*H. tridens*, GenBank号:AB334548)、1种招潮蟹(*Uca* sp., GenBank号:

DQ882169)、白纹方蟹(*Grapsus albolineatus*, GenBank号:AF317338)的COI基因序列,加上绒螯近方蟹(*Hemigrapsus penicillatus*)、肉球近方蟹(*Hemigrapsus sanguineus*)、红螯相手蟹(*Sesarma haematocheir*, *S. h-R1*)、褶痕相手蟹(*S. plicata*, *S. p-R1*) (徐敬明等,2007)及本研究2种蟹类的COI基因序列,一起比对获得隶属于方蟹总科(Grapsoidae)和沙蟹总科(Ocypodoidea)的10种蟹类577bp的同源序列(无插入/缺失位点)。上述序列之间基于Kimura-双参数距离模型估计其遗传距离,以旧金山卤虫(*Artemia franciscana*, GenBank号:NC\_001620)作外群,用NJ法(Neighbor-Joining)构建分子系统发生树(图3),系统树各节点的支持率以序列数据集1000次重复抽样检验的自引导值(Bootstrap Value)表示。

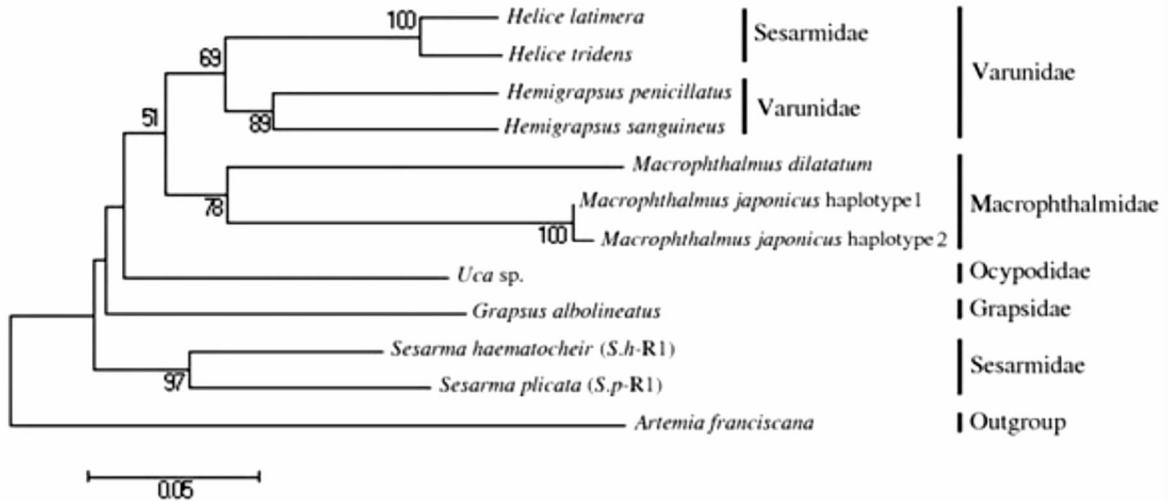


图3 10种方蟹和沙蟹的COI基因分子系统树(NJ法)

Fig.3 Neighbor-joining molecular phylogenetic tree of COI gene for 10 grapsoid and ocypodoid crabs

由系统发生树的拓扑结构(图3)可以看出,2种厚蟹和2种近方蟹各自聚为一支后,又以较高的置信度(69%)聚为一大支;2种大眼蟹聚为一支,形成了与前者并列的姊妹支;而2种相手蟹聚为系统树中最基部的一支。这表明厚蟹和近方蟹的亲缘关系最近,而与相手蟹的亲缘关系最远,但在传统的形态分类上二者的分类地位相去甚远,近方蟹属于弓蟹科(Varunidae)、厚蟹属于相手蟹科(Sesarmidae);但COI基因获得的结果却与Schubart等(2006)利用12S rRNA和16S rRNA基因得到的结论相同,即同样支持将厚蟹从相手蟹科移入弓蟹科。本研究结果也支持利用16S rRNA基因获得的大眼蟹科(Macrophthalmidae)的大眼蟹(*Macrophthalmus*)不同于沙蟹总科其它沙蟹(*Uca*),而与方蟹总科中弓蟹科的蟹类亲缘关系相对较近,二者为姊妹群关系

的结论(Kitaura et al,2002)。但这还需要对上述2科中更多种蟹类COI基因的研究来进一步探讨。

### 参考文献:

- 戴爱云,杨思凉,宋玉枝,等. 1986. 中国海洋蟹类[M]. 北京:海洋出版社:12,428-447.
- 郭天慧,孔晓瑜,陈四清,等. 2004. 三疣梭子蟹线粒体DNA 16S rRNA和COI基因片段序列的比较研究[J]. 中国海洋大学学报, 34(1): 22-28.
- 孔晓瑜,喻子牛,刘亚军,等. 2001. 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, 31(6):861-866.
- 林琪,李少菁,黎中宝,等. 2008. 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, 47(2):269-273.
- 夏得全,王文君. 1998. 动物线粒体DNA研究及在鱼类种群遗传结构中的应用[J]. 水产学报, 22(4):364-369.

- 徐敬明. 2006. 蟹类线粒体 DNA 的研究与应用[J]. 中国海洋大学学报:自然科学版,36(6):879-884.
- 徐敬明,方华华,高天翔. 2007. 两种相手蟹线粒体 COI 基因序列的比较研究[J]. 海洋通报,26(6):26-31.
- Folmer O, Black M, Hoeh W, et al. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates[J]. Molecular Marine Biology and Biotechnology, 3(5):294-299.
- Harrison J S. 2004. Evolution, biogeography, and the utility of mitochondrial 16S and COI genes in phylogenetic analysis of the crab genus *Austinixa* (Decapoda: Pinnotheridae) [J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 30:743-754.
- Kitaura J, Wada K, Nishida M. 2002. Molecular phylogeny of grapsoid and ocyrodoid crabs with special reference to the genera *Metaplax* and *Macrophthalmus*[J]. Journal of Crustacean Biology, 22(3):682-693.
- Pfeiler E, Hurtado L A, Knowles L L, et al. 2005. Population genetics of the swimming crab *Callinectes bellicosus* (Brachyura: Portunidae) from the eastern Pacific Ocean [J]. Marine Biology, 146:559-569.
- Schubart C D, Diesel R, Hedges S B. 1998. Rapid evolution to terrestrial life in Jamaican crabs[J]. Nature, 393:363-365.
- Schubart C D, Cuesta J A, Felder D L. 2002. Glyptograpsidae, a new brachyuran family from Central America: larval and adult morphology and a molecular phylogeny of the Grapsoidea[J]. Journal of Crustacean Biology, 22(1):28-44.
- Schubart C D, Cannicci S, Vannini M, et al. 2006. Molecular phylogeny of grapsoid crabs (Decapoda, Brachyura) and allies based on two mitochondrial genes and a proposal for refraining from current superfamily classification[J]. Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research, 44(3):193-199.
- Shih H T, Suzuki H. 2008. Taxonomy, phylogeny, and biogeography of the endemic mudflat crab *Helice/Chasmagnathus* complex (Crustacea: Brachyura: Varunidae) from East Asia[J]. Zoological Studies, 47(1):114-125.
- Tam Y K, Kornfield I, Ojeda F P. 1996. Divergence and zoogeography of mole crabs, *Emerita* spp. (Decapoda: Hippidae), in the Americas[J]. Marine Biology, 125(3):489-497.
- Tang B P, Zhou K Y, Song D X, et al. 2003. Molecular systematics of the Asian mitten crabs, genus *Eriocheir* (Crustacea: Brachyura) [J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 29:309-316.

(责任编辑 万月华)

## Sequence Comparison of Mitochondrial COI Gene between Two Species of Macrophthalmid Crabs

XU Jing-ming

(College of Life Science and Technology, Chongqing University of Arts and Sciences,  
Yongchuan 402168, China)

**Abstract:** Partial sequences of the mitochondrial COI gene were determined for two *Macrophthalmus* species (*M. dilatatum* and *M. japonicus*), and the length of sequence of the two species was same. of the 658 nucleotides obtained, the A, T, G and C contents were similar, the contents of *M. dilatatum* and the average contents of *M. japonicus* were 27.4%, 30.9%, 17.3%, 24.4% and 25.8%, 32.0%, 17.4%, 24.7% respectively. Three haplotypes were found in *M. dilatatum* and *M. japonicus*, the former was one and the latter was two. There were 123 (124) variable sites between the two species, including 68 (69) transition sites and 55 (55) transversion sites. The si/sv and ratio of sequence divergence were about 1.2 (1.3) and 18.69% (18.85%) respectively. The intraspecific difference (0.61%) was less than the interspecific difference. The average AT content (57.9%) of the two *Macrophthalmus* species was higher than GC content, which was similar to the results of studies on other crabs. The topological structure of the molecular phylogenetic tree revealed that a close phylogenetic relationship between Macrophthalmidae and Varunidae, forming a sister group relationship.

**Key words:** *Macrophthalmus dilatatum*; *M. japonicus*; COI; Sequence