

doi: 10.7541/2023.2022.0259

白纹方蟹线粒体基因组全序列测定及方蟹总科比较分析

韦丽明 陈 健 张 莹 吕振明 龚 理

(浙江海洋大学海洋科学与技术学院, 海洋生物种质发掘与利用国家地方联合工程研究中心, 舟山 316022)

摘要: 为探讨该总科内部亲缘关系及其与线粒体基因排序之间的相关性, 研究以方蟹科(Grapsidae)白纹方蟹(*Grapsus albolineatus*)为代表种, 测定其线粒体基因组全序列。其全长为15577 bp, 包含13个蛋白编码基因, 22个tRNA基因, 2个rRNA基因和1个控制区。基因组碱基组成为33.4% A、12.0% G、20.6% C和34.0% T, 具有明显的AT偏向性(67.4%)。除*ATP8*和*ND1*以GTG作为起始密码子外, 其余蛋白编码基因均以ATN作为起始密码子; 除*COII*和*Cyt b*以T作为不完全终止密码子外, 其余基因均以TAN作为终止密码子。亮氨酸(Leu)和半胱氨酸(Cys)分别是使用频率最高(15.28%)和最低(0.81%)的两种密码子。除*tRNA-Ser1*缺少DHU臂外, 其余tRNA均能形成典型的三叶草结构。基于13个蛋白编码基因的核苷酸序列同时构建了方蟹总科的贝叶斯树(BI)和最大似然树(ML), 两种方法构建的系统发育树拓扑结构一致, 均显示所有方蟹科(Grapsidae)种类聚在一起, 其中白纹方蟹与同属的细纹方蟹(*G. tenuicrustatus*)的亲缘关系最近; 相手蟹科(Sesarmidae)与怪方蟹科(Xenograpsidae)形成姐妹群关系后与地蟹科(Gecarcinidae)聚为一支, 三者与方蟹科互为姐妹群, 弓蟹科(Varunidae)则为相对独立的一支。研究还比较分析了方蟹总科(Grapsoidea)的线粒体基因排序情况, 并发现方蟹总科基因重排和系统发育有着明显的相关性。研究系统地阐述了方蟹总科的系统发育关系, 为更好地理解基因重排和系统发育之间的关系提供了理论支撑。

关键词: 短尾次目; 方蟹科; 线粒体全序列; 基因重排; 系统进化; 白纹方蟹

中图分类号: Q347

文献标识码: A

文章编号: 1000-3207(2023)08-1237-11



方蟹总科(Grapsoidea)是十足目(Decapoda)短尾次目(Brachyura)中物种最丰富的类群之一, 根据WoRMS网站记载(<https://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=106706>), 该总科目前包括地蟹科(Gecarcinidae)、雕方蟹科(Glyptograpsidae)、方蟹科(Grapsidae)、盾牌蟹科(Percnidae)、斜纹蟹科(Plagusiidae)、相手蟹科(Sesarmidae)、弓蟹科(Varunidae)、怪方蟹科(Xenograpsidae)和似扁方蟹科(Leptograpsodidae) 9科16属共780个物种^[1-3], 其中部分种类(如中华绒螯蟹)还是常见的渔业资源和养殖对象, 具有重要的经济价值。由于方蟹总科具有较高的形态和生态多样性, 长期以来该类群的分类和系统发育关系存在诸多争议^[4-6]。如原方蟹科中的方蟹亚科(Grapsinae)、弓蟹亚科(Varuninae)、相手蟹亚科(Sesarminae)和斜纹蟹亚科(Plagusiinae)

均已提升为独立的科^[4]; 原隶属弓蟹科(Varunidae)的怪方蟹属(*Xenograpsus*)被提升为独立的怪方蟹科(Xenograpsidae)^[5]; 红螯螳臂蟹(*Chiromantes haematocheir*), 先后被命名为红螯相手蟹(*Sesarma haematocheir*)、*Perisesarma haematocheir*、*Grapsus (Pachysoma) haematocheir*等, 自相手蟹科从方蟹科独立出来后, 其重新归于相手蟹科螳臂蟹属(*Chiromantes*)^[6]。不难发现方蟹总科不管是在科级阶元还是在物种水平均存在较多争论。

相比形态学研究, 方蟹总科分子生物学研究起步更晚, 直到2000年左右Schubart等^[7]率先基于线粒体16S rRNA基因序列对美洲的方蟹进行了系统学的研究。差不多在同一时期, 我国学者对方蟹总科也开展了分子生物学研究, 如戴爱云等^[8]基于厚蟹下眼缘的一系列颗粒状隆脊特征认为天津厚蟹

收稿日期: 2022-06-24; 修订日期: 2022-09-01

基金项目: 省属高校基本科研业务费(2021JZ003)资助 [Supported by the Basic Scientific Research Operating Expenses of Zhejiang Provincial Universities Under Contract (2021JZ003)]

作者简介: 韦丽明(1998—), 女, 硕士; 研究方向为海洋生物学与生物海洋学。E-mail: 15177897741@163.com

通信作者: 龚理(1988—), 男, 副研究员; 研究方向为海洋生物适应性进化。E-mail: gongli1027@163.com

(*Helice tientsinensis*)与侧足厚蟹(*H. latimera*)是两个不同的物种,而徐敬明^[9]通过比较分析两者的线粒体12S rRNA、16S rRNA和CO I 序列则认为天津厚蟹和侧足厚蟹为同种异名。孔晓瑜等^[10]以CO I 基因作为分子标记对黄河口和珠江流域中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)及日本绒螯蟹(*E. japonica*)进行研究,结果发现黄河口和珠江流域的中华绒螯蟹CO I 序列完全一致,而两者与日本绒螯蟹的CO I 序列差异较大,认为存在中华绒螯蟹和日本绒螯蟹两个物种,或者为同一物种的两个不同地理亚种,Zhao等^[11]的研究结果也支持这一观点,但孙红英等^[12]以16S rRNA为分子标记构建5种绒螯蟹类的系统发育树,结果显示中华绒螯蟹和日本绒螯蟹为同一物种。经典形态学分类方法认为方蟹总科是单系群^[1, 13],但越来越多的分子数据表明方蟹总科是多系起源^[13–16]。

虽然当前有不少关于方蟹总科分子生物学方面的研究,但涉及的物种非常少或者是仅基于单基因或少数基因片段,有效信息位点十分有限,因此方蟹总科内部亲缘关系一直没有得到系统全面的探讨,该类群的系统进化关系也一直存在争议^[17–20]。在众多分子标记中,线粒体基因组全序列因结构简单、进化速率快且不同区域进化速率各异及母系遗传等特点被广泛应用于物种鉴定、群体遗传结构、适应性进化及系统发育等研究领域^[21–24]。如Sun等^[24]基于线粒体基因组全序列首次揭示了胸孔亚派(Thoracotremata)豆蟹总科(Pinnotheroidea)和珊瑚蟹总科(Cryptochiroidea)的进化地位,并提出共生生活方式可能是胸孔亚派的一个祖征,这种生活方式在珊瑚蟹中得以保留。研究进一步阐释了沙蟹和方蟹总科内部科的系统进化关系,建议将沙蟹总科大眼蟹科(Macrophthalmidae)的霍氏三强蟹(*Tritodynamia horvathi*)归入方蟹总科弓蟹科(Varunidae)中。此外,也有不少学者提出将线粒体基因排序作为一种新的分子标记用于系统进化等领域^[21, 25–27]。如Zhang等^[27]同时基于分子序列和基因排序重建了寄居蟹总科(Paguroidea)的系统发育关系,两者均支持寄居蟹科(Paguridae)、陆寄居蟹科(Coenobitidae)和门螯寄居蟹科(Pylochelidae)的单系性及活额寄居蟹科(Diogenidae)的并系性;虽然基于基因排序构建的系统发育树在某些属间亲缘关系解析度较低,但是作者提出在今后的研究中可以通过整合分子序列和基因排序来解决一些长期存在争议的系统发育问题。

方蟹科有20个属超过250个物种,在维持物种多样性及生态系统稳定性发挥重要作用,而了解物

种遗传资源和种间亲缘关系是保护生物学的关键内容;但目前GenBank数据库中仅公布了5个方蟹科物种线粒体基因组序列,这严重阻碍了方蟹科分子系统学及保护生物学研究。方蟹科白纹方蟹(*Grapsus albolineatus*)广布于印度洋和太平洋沿海海域,常栖息于珊瑚礁或者高潮线的岩礁上,擅长攀岩跳跃,所以又称岩蟹。白纹方蟹色彩艳丽,甲壳整体呈独特的青绿色,壳体和步足分布有红褐色和黄色花纹,最显著的特征是背甲中心长有一个蝴蝶结状的褐黄色花纹。早期的研究多聚焦于该物种形态和行为等方面^[8, 28, 29],少有研究关注其分子生物学特征及系统进化地位。因此,本研究以白纹方蟹为研究对象,测定分析其线粒体基因组全序列特征并重建方蟹总科系统发育关系,同时比较分析方蟹总科的线粒体基因重排情况,以期阐明白纹方蟹的分类地位,厘清方蟹总科内部各科之间的系统发育关系,探究基因重排在系统进化中的适用性。

1 材料与方法

1.1 样本采集、保存及测序

实验用1只雌性白纹方蟹(头胸甲长63.1 mm,宽69.2 mm)采于海南省陵水新村码头(18°27'17.43"N; 110°01'21.31"E),用95%的酒精将新鲜的样品固定并运回实验室后进行形态学鉴定。样品鉴定参考《中国海洋蟹类》^[8]。取约100 g肌肉组织利用二代测序技术进行线粒体基因组全序列测定(上海元莘生物医药科技有限公司)。测序前先使用插入片段大小为400 bp的VAHTS Universal Plus DNA文库制备试剂盒构建基因文库,在Illumina NovaSeq 6000高通量测序平台进行PE150测序;使用NOVO-Plasty软件对去除接头的有效数据(Clean data)进行从头组装;将细纹方蟹(*G. tenuicrustatus*)线粒体基因组(GenBank登录号: NC_029724)作为种子序列进行序列延伸。为了评估二代测序的准确性,本研究还利用一代测序技术(Sanger测序)测定了线粒体CO I、ND1和Cyt b基因的部分序列,比较两种测序方法得到的序列相似性。

1.2 序列的注释及分析

利用MITOS Web Server^[30]和tRNAscan-SE^[31, 32]对白纹方蟹线粒体基因组全序列中的蛋白编码基因、tRNA基因和rRNA基因进行基因预测,白纹方蟹线粒体基因组与方蟹科物种进行BLAST比对再次确认,使用Sequin软件(version 15.10, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Sequin/>)对白纹方蟹线粒体全序列进行注释。使用BLAST Ring Image Generater (BRIG)^[33]绘制线粒体基因组环形图;使用MEGA X计算白纹

方蟹线粒体基因组的碱基组成、氨基酸使用情况及相对同义密码子使用率(RSCU)。

1.3 构建系统进化树

以寄居蟹总科(Paguroidea)的黑体寄居蟹(*Pagurus nigrofascia*)和短腕陆寄居蟹(*Coenobita brevipennis*)作为外类群, 从GenBank数据库中下载39条方蟹总科线粒体基因组全序列, 基于13个蛋白编码基因, 使用PhyloSuite^[34]同时构建方蟹总科最大似然树(ML)和贝叶斯树(BI)。最大似然树使用IQ-TREE构建, 其中“Bootstrap”设置为Ultrafast, “Num of Bootstrap”设置为100000, 抽样次数为1000。贝叶斯树使用MrBayes构建, 使用4条蒙特卡罗马尔可夫链(Markov Chain Monte Carlo, MCMC)同时运行2000000代, 抽样频率为1000, 摒弃25%的老化样本。

2 结果

2.1 白纹方蟹线粒体基因组结构

一代测序得到的*CO I*、*ND1*和*Cyt b*与二代测序得到的序列相似性均高于99.9%, 仅个别碱基存

在差异, 表明二代测序方法及组装结果可信。本研究测定的白纹方蟹线粒体基因组全序列已提交至GenBank数据库(登录号为OM055662), 其线粒体基因组全长为15577 bp, 共编码37个基因, 包括13个蛋白编码基因、22个tRNA基因和2个rRNA基因; 此外还有一段长的非编码序列, 称控制区(CR)或AT-rich区。在这些基因中, 有14个基因由轻链(Light strand)编码, 其中包括8个tRNA基因[tRNA-His、Phe、Pro、Leu (*L_I*)、Val、Gln、Cys和Tyr]、4个蛋白编码基因(*ND5*、*ND4*、*ND4L*和*ND1*)和2个rRNA基因; 其余23个基因均由重链(Heavy strand)编码(图1和表1)。白纹方蟹线粒体基因组总的碱基组成为A (33.4%)、T (34.0%)、G (12.0%)和C (20.6%), 具有较高的AT偏向性(67.4%), AT-skew和GC-skew分别为-0.009和-0.262(表2)。控制区位于12S rRNA基因和tRNA-Ile (*I*)基因之间, 长度为615 bp, 四种碱基含量分别为: A (43.1%)、T (35.1%)、G (9.3%)和C (12.5%), 具有明显的AT偏向性(78.2%; 表2)。

白纹方蟹线粒体基因排列紧凑, 其中13处基因

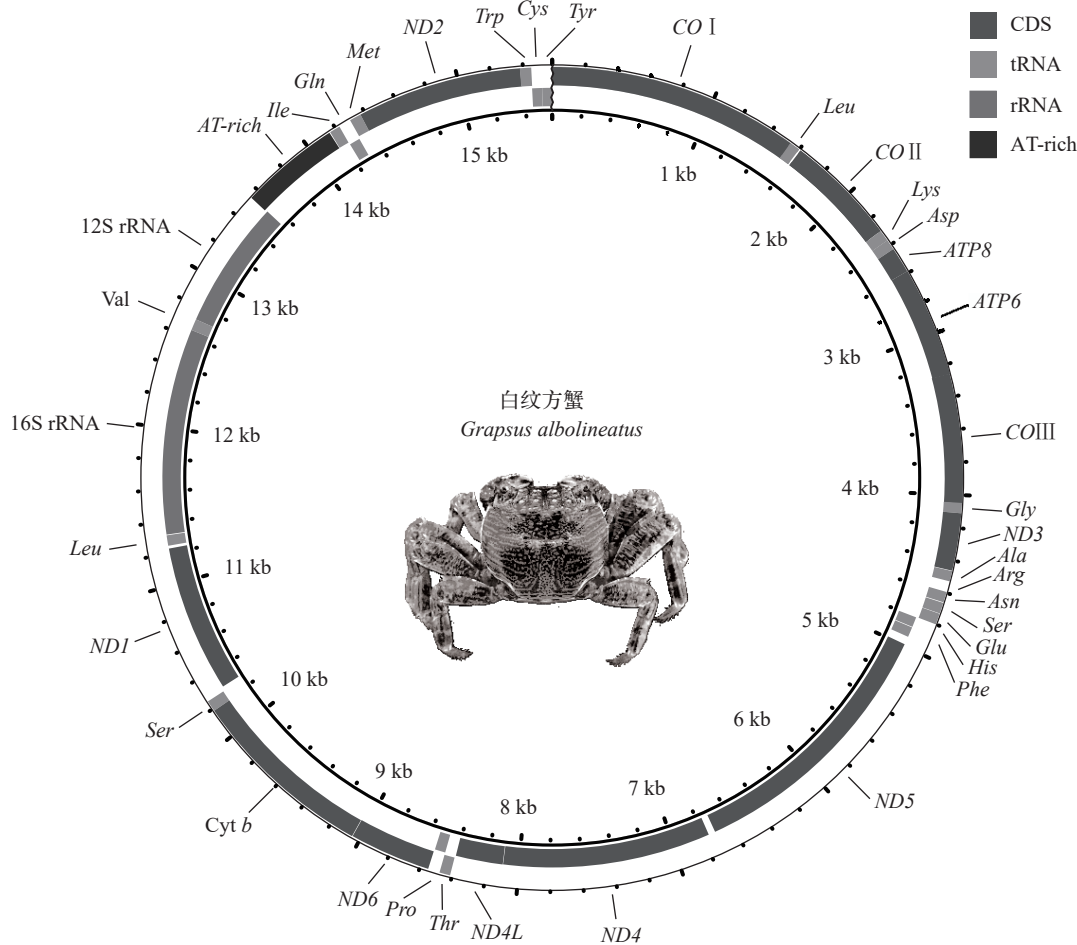


图1 白纹方蟹线粒体基因组基因环形图
Fig. 1 Gene map of the *G. albolineatus* mitogenome

无缝衔接,即不存在任何基因间隔和重叠;11处存在基因重叠(1—7 bp),其中包含4处常见的后生动物线粒体基因重叠区: *ATP8-ATP6*、*ATP6-COIII*、*ND4-ND4L*和*ND6-Cyt b*;14处存在基因间隔(1—52 bp),其中最长的基因间隔在*ND5*和*tRNA-Phe*之间(52 bp),*ND4*和*ND5*之间的基因间隔次之(44 bp)。

2.2 蛋白质编码基因

白纹方蟹线粒体基因组中的13个蛋白质编码基因总长为11168 bp,其中*ND5*最长(1731 bp),*ATP8*最短(159 bp),共编码3712个氨基酸(表1和表2)。除*ATP8*和*ND1*的起始密码子为GTG外,其他蛋白质编码基因的起始密码子均为ATN (ATG、ATA、

表1 白纹方蟹线粒体基因组特征
Tab. 1 Features of the mitochondrial genome of *G. albolineatus*

基因 Gene	位点Position		长度 Length (bp)	氨基酸 Amino acid	起始/终止密码子 Start/Stop codon	反密码子 Anticodon	基因间隔 Intergenic region	编码链 Strand
	From	To						
<i>CO I</i>	1	1539	1539	513	ATG/TAG		−5	H
<i>Leu (L₂)</i>	1535	1599	65			TTA	10	H
<i>CO II</i>	1610	2297	688	229	ATG/T		0	H
<i>Lys (K)</i>	2298	2367	70			AAA	−1	H
<i>Asp (D)</i>	2367	2430	64			GAC	0	H
<i>ATP8</i>	2431	2589	159	52	GTG/TAA		−7	H
<i>ATP6</i>	2583	3257	675	224	ATT/TAA		−1	H
<i>CO III</i>	3257	4048	792	263	ATG/TAA		−1	H
<i>Gly (G)</i>	4048	4110	63			GGA	0	H
<i>ND3</i>	4111	4461	351	116	ATC/TAA		−2	H
<i>Ala (A)</i>	4460	4523	64			GCA	6	H
<i>Arg (R)</i>	4530	4593	64			CGA	1	H
<i>Asn (N)</i>	4595	4659	65			AAC	4	H
<i>Ser (S_I)</i>	4664	4730	67			AGA	2	H
<i>Glu (E)</i>	4733	4800	68			GAA	3	H
<i>His (H)</i>	4804	4868	65			CAC	4	L
<i>Phe (F)</i>	4873	4937	65			TTC	52	L
<i>ND5</i>	4990	6720	1731	576	ATG/TAA		44	L
<i>ND4</i>	6765	8102	1338	445	ATG/TAG		−7	L
<i>ND4L</i>	8096	8398	303	100	ATG/TAA		14	L
<i>Thr (T)</i>	8413	8478	66			ACA	0	H
<i>Pro (P)</i>	8479	8546	68			CCA	8	L
<i>ND6</i>	8555	9052	498	165	ATA/TAA		−1	H
<i>Cyt b</i>	9052	10186	1135	378	ATG/T		0	H
<i>Ser (S₂)</i>	10187	10254	68			TCA	27	H
<i>ND1</i>	10282	11229	948	315	GTG/TAA		23	L
<i>Leu (L_I)</i>	11253	11319	67			CTA	0	L
16S rRNA	11320	12646	1327				0	L
<i>Val (V)</i>	12647	12719	73			GUA	0	L
12S rRNA	12720	13546	827				0	L
AT-rich	13547	14161	615				0	H
<i>Ile (I)</i>	14162	14228	67			ATC	−3	H
<i>Gln (Q)</i>	14226	14294	69			CAA	7	L
<i>Met (M)</i>	14302	14372	71			ATG	0	H
<i>ND2</i>	14373	15383	1011	336	ATT/TAG		−2	H
<i>Trp (W)</i>	15382	15450	69			TGA	−1	H
<i>Cys (C)</i>	15450	15513	64			TGC	0	L
<i>Tyr (Y)</i>	15514	15577	64			TAC	0	L

ATT及ATC); 绝大多数编码基因以TAA作为终止密码子, *CO I*、*ND4*及*ND2*以TAG为终止密码子, *CO II*和*Cyt b*则以T作为不完全终止密码子(表 1)。

氨基酸使用频率分析显示白纹方蟹线粒体基因组中亮氨酸(Leu)使用频率最高, 占氨基酸总数的15.28%, 丝氨酸(Ser)次之, 占总数10.35%, 而半胱氨酸(Cys)最低, 占总数0.81%(图 2A)。根据相对同义密码子使用频率可知蛋白质编码基因的密码子使用存在强烈的偏好性, 其中NNU和NNA的RSCU值基本上都大于1, 表明密码子第三位位点为T和A的使用频率高(图 2B)。

2.3 tRNA基因和rRNA基因

白纹方蟹线粒体基因组的22个tRNA基因的长度介于63 (*tRNA-Gly*)—73 bp (*tRNA-Val*), 总长为1466 bp。通过tRNAscan-SE对这些tRNA的二级结构进行预测, 发现除*tRNA-Ser1*缺少DHU臂外, 其他tRNA都能形成典型的三叶草结构, 该现象也常见于其他短尾类和脊椎动物线粒体基因组。这些tRNA的二级结构基本一致, 反密码子环均由7个核苷酸对组成, 氨基酸接受臂均由7个核苷酸对组成, 反密码臂由4(仅*tRNA-Ser1*和*tRNA-Asp*)—5个核苷酸对组成, DHU环由4(*tRNA-Arg*)—13(*tRNA-Ser1*)个核苷酸对组成。tRNA二级结构也允许存在碱基错配现象, 白纹方蟹22个tRNA基因中G-U错配

最多(29处), 其中*tRNA-Tyr*最多(4处), *tRNA-Cys*、*tRNA-Gln*和*tRNA-Ser2*分别有3处, *tRNA-Gly*、*tRNA-Lys*、*tRNA-Pro*和*tRNA-Val*分别有2处, *tRNA-Ala*、*tRNA-Arg*、*tRNA-Glu*、*tRNA-His*、*tRNA-Leu1*、*tRNA-Leu2*、*tRNA-Met*和*tRNA-Ser1*分别有1处; 其次为U-U错配(3处), 分别存在于*tRNA-His*、*Leu1*、*Met*; 最后为C-U和A-C各一处, 分别位于*tRNA-Lys*和*tRNA-His*。

白纹方蟹线粒体基因组中的两个rRNA基因都位于轻链, 总长为2154 bp, 氨基酸组成: 36.4%A、36.4%T、17.5%G、9.8%C、AT-skew和GC-skew分别为0.001和0.281(表 2)。其中, *16S rRNA*位于*tRNA-Leu1*与*tRNA-Val*之间, 长度为1327 bp; *12S rRNA*位于*tRNA-Val*与控制区之间, 长度为827 bp(表 1)。

2.4 方蟹总科线粒体基因排序

白纹方蟹线粒体基因组与短尾次目祖先型共享同一种基因排序, 即与十足目祖先型线粒体基因组相比, 它们的*F-ND5-H*基因发生了重排, 变成了*H-F-ND5*基因排序。本研究比较分析了所有40种方蟹总科物种的线粒体基因组结构和基因排序, 结果显示: 方蟹科(Grapsidae)和地蟹科(Gecarcinidae)共10个物种与短尾次目祖先型线粒体基因组排序一致(图 3B), 而相手蟹科(Sesarmidae)、怪方蟹科

表 2 白纹方蟹线粒体基因组的核苷酸组成和偏向性
Tab. 2 Nucleotide composition and skewness of *G. albolineatus* mitogenome

基因 Gene	核苷酸组成Nucleotide composition					AT偏倚 AT-skew	GC偏倚 GC-skew	长度 Length (bp)
	A%	T%	G%	C%	(A+T)%			
Mitogenome	33.4	34.0	12.0	20.6	67.4	−0.009	−0.262	15577
PCGs	27.3	37.7	16.8	18.2	65.0	−0.159	−0.040	11168
<i>CO I</i>	26.8	34.4	16.4	22.4	61.1	−0.124	−0.154	1539
<i>CO II</i>	30.7	33.2	14.2	21.9	63.9	−0.039	−0.213	688
<i>ATP8</i>	28.9	45.3	7.5	18.2	74.2	−0.220	−0.415	159
<i>ATP6</i>	28.3	36.9	12.1	22.7	65.2	−0.132	−0.302	675
<i>CO III</i>	28.5	33.6	15.7	22.2	62.1	−0.081	−0.173	792
<i>ND3</i>	26.8	38.2	12.3	22.8	65.0	−0.175	−0.301	351
<i>ND5</i>	29.3	38.4	20.7	11.7	67.6	−0.134	0.279	1731
<i>ND4</i>	27.8	39.5	22.7	9.9	67.3	−0.174	0.391	1338
<i>ND4L</i>	28.4	41.6	21.8	8.3	70.0	−0.189	0.451	303
<i>ND6</i>	23.9	43.4	10.2	22.5	67.3	−0.290	−0.374	498
<i>Cyt b</i>	26.6	35.4	14.2	23.8	61.9	−0.142	−0.252	1135
<i>ND1</i>	23.9	41.6	22.6	11.9	65.5	−0.269	0.309	948
<i>ND2</i>	25.8	39.8	10.7	23.7	65.6	−0.213	−0.379	1011
tRNAs	35.2	36.0	16.7	12.1	71.2	−0.011	0.159	1466
rRNAs	36.4	36.4	17.5	9.8	72.7	0.001	0.281	2154
AT-rich	43.1	35.1	9.3	12.5	78.2	0.102	−0.149	615

(Xenograpsidae)和弓蟹科(Varunidae)共30个物种线粒体基因组则进化出新的基因排序。其中相手蟹科共12个物种的线粒体基因组共享同一种基因重排,与十足目祖先型线粒体基因组相比,它们的基因组除了拥有短尾次目祖先型都共享的*H-F-ND5*基因重排外,它们的*I-Q-M*基因簇变成了*Q-I-M*排序,而其余基因位置未发生任何变化(图 3C)。怪方蟹科目前仅有怪方蟹属(*Xenograpsus*)2个物种公布了线粒体基因组全序列^[19, 35],虽然公布的这两个物种在*N-SI-E-T*及*N-R-E-T*基因簇排序略有区别,但是通过对其线粒体基因组重新分析后发现,存在差异的基因是因为乌龟怪方蟹(*Xenograpsus testudinatus*, GenBank 登录号 EU727203)部分基因注释有误。实际上这两条线粒体全序列共享了同一种基因重排,它们除了拥有短尾次目祖先型都共享的*H-F-ND5*基因重排外,还有2处共8个基因发生了重排:一处是*T-ND6-Cyt b-S2*整体移位至*A-R-N-SI-E*基因簇下游,另一处是*A-R-N-SI-E*基因簇中*A-R*基因及*I-Q-M*基因簇中的*I*基因移位至了*W-C-Y*基因簇,同时伴随着*W*基因移位(图 3D)。在这4种重排类型中,弓蟹科种类发生重排的规模最大。弓蟹科共16个物种也共享同一套线粒体基因组重排,除了*CO I-L2-CO II-ATP8-ATP6-COIII-G-ND3-A-R-N-SI-E-F-ND4-ND4L-ND6-Cyt b-S2*和*I-M-ND2-W*共19个基因保留在原来的位置,其余15个基因均发生

了明显的重排。如*ND1-L1-16S-V-12S*基因整体移位至*A-R-N-SI*基因簇下游,其他基因则散乱分布在基因组中(图 3E)。

2.5 系统进化分析

本研究以黑体寄居蟹(*P. nigrofascia*)和短腕陆寄居蟹(*C. brevimanus*)为外类群,基于13个蛋白编码基因的核苷酸序列同时构建了方蟹总科的贝叶斯树(BI)和最大似然树(ML)。两种方法构建的系统发育树拓扑结构完全一致(图 4),但部分分支节点支持率略有区别:贝叶斯树(BI)的支持率普遍高于最大似然树(ML),绝大多数节点支持率为1;而最大似然树(ML)的支持率除一处节点为59(隆背张口蟹和中型圆方蟹之间的节点)外其余节点支持率均在76—100。方蟹总科系统发育树结果显示:在科级阶元,各科物种均各聚为一支,其中相手蟹科和怪方蟹科亲缘关系最近,两者形成姐妹群关系后与地蟹科聚在一起,三者再与方蟹科聚为一大支;弓蟹科亲缘关系相对较远,单独聚为一大支。在属级阶元,几乎所有属均分别单独聚为一支,但是值得注意的是相手蟹科中的中华相手蟹(*Sesarmops sinensis*)与红螯螳臂相手蟹(*C. haematocheir*)聚在一起,近亲拟相手蟹(*Parasesarma affinis*)与双齿近相手蟹(*Perisesarma bidens*)聚在一起,暗示这些物种在分类或者鉴定方面存在问题,需要进一步深入探讨。在物种阶元,本研究中测定的白纹方蟹与细纹

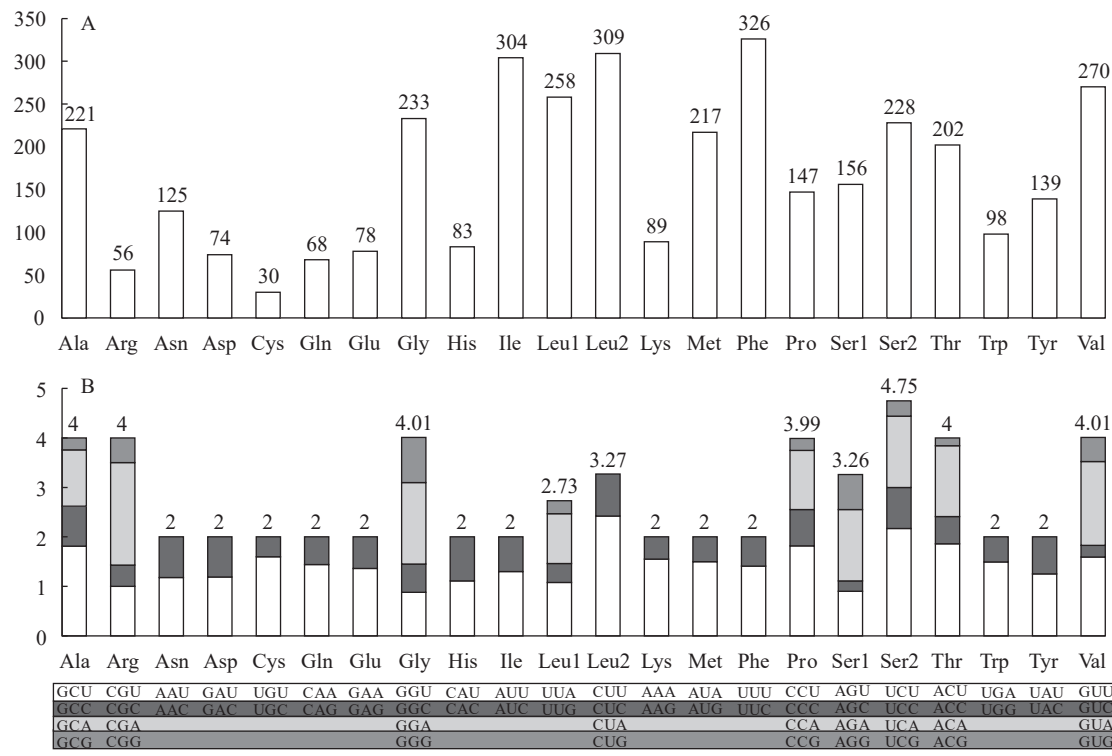


图 2 白纹方蟹线粒体基因组氨基酸使用情况 (A) 及相对同义密码子使用频率 (B)

Fig. 2 The frequency of amino acid (A) and relative synonymous codon usage (RSCU) (B) in the mitogenome of *G. albolineatus*

方蟹亲缘关系最近, 两者形成姐妹群关系(图 4)。

研究进一步分析了方蟹总科线粒体基因排序和系统进化之间的关系, 系统发育树显示两者有着十分明显的相关性。方蟹科和地蟹科的线粒体基因组与短尾次目祖先型线粒体基因组排序一致, 与十足目祖先型相比, 它们的基因组发生重排的基因很少, 仅 *F-ND5-H* 基因簇发生了重排(变成了 *H-F-ND5* 排序; 图 3B), 这两个科位于系统树的最末端; 弓蟹科的线粒体基因组发生重排的规模最大(图 3E), 共有 15 个基因位置发生了明显的变化, 而该科位于系统树的基部; 其余两个科(相手蟹科和怪方蟹科)线粒体基因组重排规模中等, 它们刚好位于系统树的中间。总体上, 系统树从末端到基部, 对应的线粒体基因组重排规模呈逐渐增大的趋势。

3 讨论

方蟹总科系统进化长期以来备受关注, 但是由于多数研究涉及物种偏少或者所用分子标记信息位点不足, 导致该类群内部亲缘关系一直缺乏定论^[17, 19, 20]。本研究基于 13 个蛋白编码基因构建了

目前为止最全面的方蟹总科系统发育树, 结果显示: 在科级阶元, 方蟹总科分为两大支, 弓蟹科构成其中一支, 另一支则由方蟹科、地蟹科、相手蟹科和怪方蟹科组成, 其中相手蟹科与怪方蟹科有着最近的亲缘关系, 两者形成姐妹群再与地蟹科聚为一支, 这三个科之间的亲缘关系与大多数研究结果一致^[36-38]; 但是也有部分研究显示相手蟹科与地蟹科亲缘关系最近^[39-41], 还有研究质疑地蟹科可能是非单系群。现有系统树中地蟹科和怪方蟹科代表种类偏少, 如刑雨辉等^[39]研究中地蟹科和怪方蟹科均各只包括一个代表种, 本研究中怪方蟹科也只有 2 个物种。代表种类不足可能是造成三科之间系统关系不稳定的主要原因, 后续研究需进一步扩大取样范围, 得出更可靠的结论。值得注意的是在属级阶元, 相手蟹科中相手蟹属的中华相手蟹(*S. sinensis*)混入了螳臂蟹属(*Chiromantes*), 拟相手蟹属的近亲拟相手蟹(*P. affinis*)混入了近相手蟹属(*Perisesarma*)。Zhang 等^[23]对前一现象进行了解释, 研究指出中华相手蟹与红螳螳臂相手蟹线粒体基因组全序列相似性为 98.7%, 两者 *CO I* 序列相似性高达

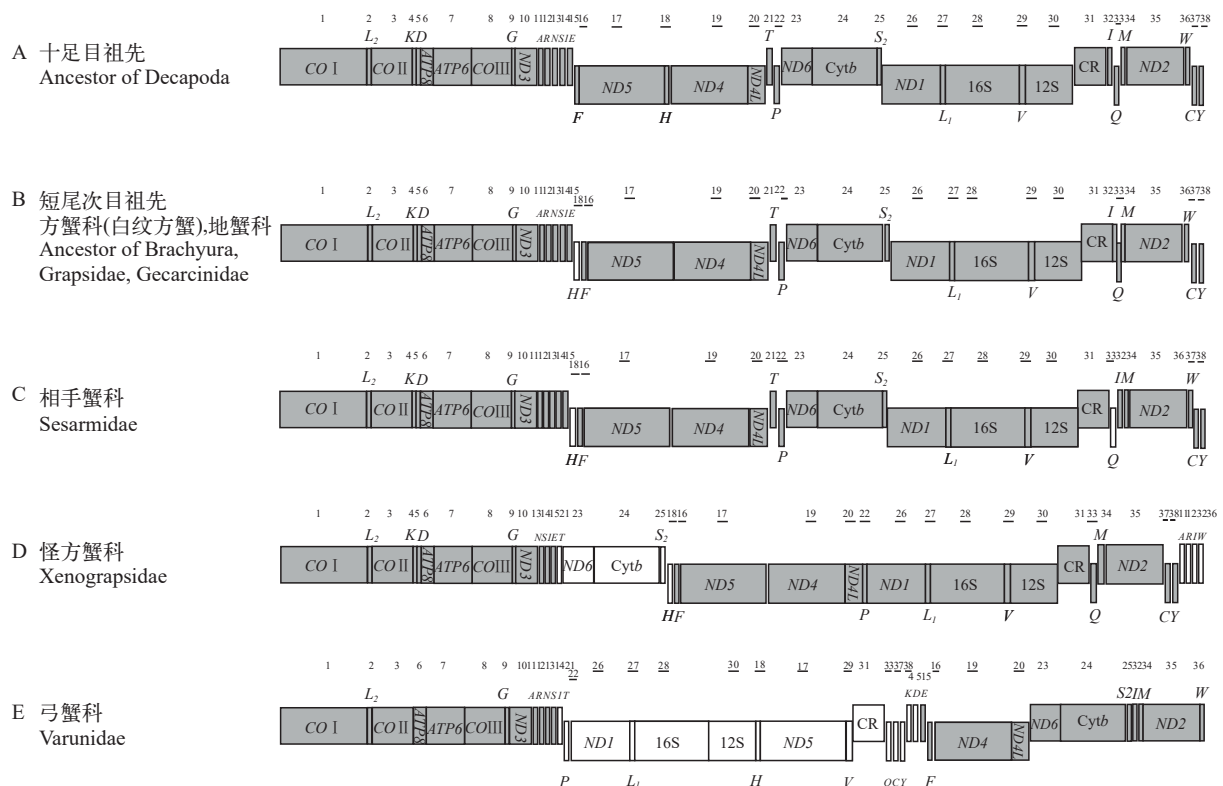


图 3 方蟹总科线粒体基因组不同基因排序类型

Fig. 3 The different gene arrangement of Grapsoidea

数字 1—38 表示十足目祖先型线粒体基因相对排序, 数字下划线表示轻链编码基因; 灰色标记表示未发生基因重排, 白色标记表示发生了基因重排

Numbers 1—38 indicate relative gene order of Decapoda ancestral type, genes of L-strand are marked in underlined, gray markers indicate that no gene rearrangement, a white marker indicates gene rearrangement

99.9%, 表明两者为同一物种, 中华相手蟹极有可能鉴定有误。针对近亲拟相手蟹混入近相手蟹属现象, 本研究比较分析了近亲拟相手蟹与双齿近相手蟹线粒体基因组序列相似性, 结果发现两者线粒体基因组全序列相似性为99.7%, CO I 序列相似性为100%, 表明双齿近相手蟹很可能鉴定有误。近相

相手蟹属(*Perisesarma*)与拟相手蟹属(*Parasesarma*)在分类上存在诸多混乱, 有研究提议将两者合并成一个新属^[42]; 实际上Worms网址已将*P. bidens*重新命名为*Parasesarma bidens*。是否需要定义新属还是将原近相手蟹属并入拟相手蟹属, 需要对更多的相手蟹样品进行更深入的研究。

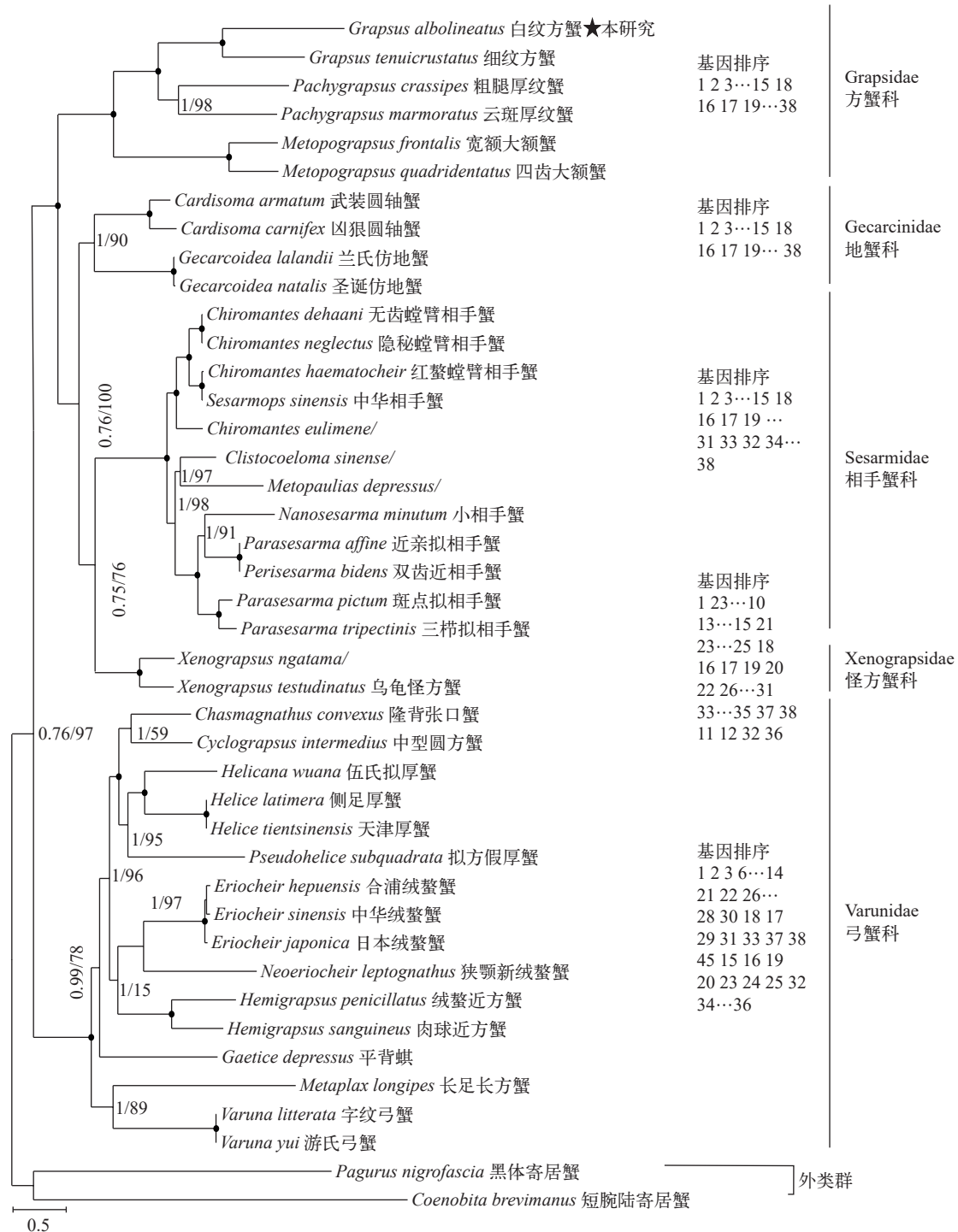


图 4 基于13个蛋白编码基因构建的方蟹总科最大似然树 (ML) 和贝叶斯树 (BI)

Fig. 4 Phylogenetic tree of Grapsoidea species inferred from 13 PCGs based on maximum likelihood (ML) analysis and Bayesian inference (BI)

一般而言, 脊椎动物的线粒体基因组排序比较稳定, 发生重排的概率比较低^[43]; 相对而言, 无脊椎动物线粒体基因组发生重排的现象较为普遍, 如头足类^[44]、双壳类^[45]、棘皮动物^[46]和节肢动物^[47]等类群的线粒体基因组都存在丰富的基因重排类型。有学者认为线粒体基因排序可以作为一种新的分子标记, 辅助系统发育分析^[25, 47, 48], 如Kong等^[49]比较分析了舌鳎科(包括舌鳎亚科和无线鳎亚科)和鳎科的线粒体基因组排序, 发现所有舌鳎亚科种类线粒体控制区移位至*ND1*基因下游, 同时伴随着*IQM*基因簇排序变化(*IQM*变成了*QIM*), 而鳎科和无线鳎亚科种类相应基因位置未发生变化, 跟其他硬骨鱼一样拥有经典的基因排序, 从而提出舌鳎亚科很可能是一个单系群, 这与形态分类学结果一致; Zhang等^[25]在溪蟹科(Potamidae)线粒体基因组中发现了9种不同的基因重排模式, 作者进一步对基因重排和系统发育之间的关系进行分析, 结果显示线粒体基因组的排序信息可以为近溪蟹亚科(Potamiscinae)内部的系统发育关系提供强有力的支持。Sun等^[24]比较分析了沙蟹总科、方蟹总科、豆蟹总科和珊瑚蟹总科的线粒体基因组排序, 并重建了基因重排的进化过程, 首次提出了基因重排与胸孔亚派物种生活方式有关。本研究分析了方蟹总科系统发育跟线粒体基因排序之间的关系, 结果显示两者有非常好的相关性, 即线粒体基因组重排的复杂性一定程度上可以反映系统发育关系。但是在生活方式和生境方面, 基因组排序并没有表现出明显的相关性。例如方蟹科、相手蟹科和弓蟹科物种活动能力较强, 主要分布于潮间带和河口半咸水附近, 但是3个科的线粒体基因排序均不一样; 而地蟹科物种活动范围广, 主要分布在陆上区域, 生境跟方蟹科差异明显, 但其基因组排序却和方蟹科完全一致; 怪方蟹科生境极其特殊, 分布在深海热泉旁, 其基因组表现出独特的排序。当然, 方蟹总科目前仅有5个科具有线粒体基因组信息, 未来需要更多的科代表种类来验证基因排序与系统发育关系、生活方式和生境等之间的关系。

参考文献:

- [1] Guinot D, Ng N K, Moreno P A R. Review of grapsoid families for the establishment of a new family for Leptograpsodes Montgomery, 1931, and a new genus of Gecarcinidae H. Milne Edwards, 1837 (Crustacea, Decapoda, Brachyura, Grapsoidea MacLeay, 1838) [J]. *Zoosystema*, 2018, **40**(sp1): 547-604.
- [2] Bianchi C N, Gerovasileiou V, Morri C, et al. Distribution and ecology of Decapod Crustaceans in Mediterranean marine caves: a review [J]. *Diversity*, 2022, **14**(3): 176.
- [3] Schubart C D, Cuesta J A, Felder D L. Glyptograpsidae, a new brachyuran family from central America: larval and adult morphology, and a molecular phylogeny of the grapsoidea [J]. *Journal of Crustacean Biology*, 2002, **22**(1): 28-44.
- [4] Dana J D. On the classification of the Crustacea Grapsoidea [J]. *The American Journal of Science and Arts*, 1851(12): 283-290.
- [5] Ng N K, Davie P J F, Schubart C D, et al. Xenograpsidae, a new family of grapsoid crabs (Crustacea: Brachyura) associated with shallow water hydrothermal vents [J]. *Raffles Bulletin of Zoology, Supplement*, 2007(16): 233-256.
- [6] Schram F R. Checklist of marine biota of China Seas [J]. *Journal of Crustacean Biology*, 2010, **30**(2): 339.
- [7] Schubart C D, Cuesta J A, Diesel R, et al. Molecular phylogeny, taxonomy, and evolution of nonmarine lineages within the American grapsoid crabs (Crustacea: Brachyura) [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2000, **15**(2): 179-190.
- [8] Dai A Y, Yang S L, Song Y Z, et al. Crabs of the China Seas [M]. Beijing: China Ocean Press, 1986: 458. [戴爱云, 杨思谅, 宋玉枝, 等. 中国海洋蟹类 [M]. 北京: 海洋出版社, 1986: 458.]
- [9] Xu J M. Studies on genetic diversity and taxonomic status of the crab genus *Helice* [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2007: 41-67. [徐敬明. 厚蟹遗传多样性与分类地位的研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2007: 41-67.]
- [10] Kong X Y, Yu Z N, Liu Y J, et al. Comparative study of mitochondrial COI gene fragment between Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) and Japanese mitten crab (*Eriocheir japonica*) [J]. *Journal of Ocean University of Qingdao*, 2001, **31**(6): 861-866. [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(自然科学版), 2001, **31**(6): 861-866.]
- [11] Zhao J, Murphy R W, Li S. Relationships of mitten crabs (*Eriocheir*) from inland rivers of China inferred from cytochrome oxidase subunit I sequences [J]. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2002, **30**(10): 931-941.
- [12] Sun H Y, Zhou K Y, Yang X J. Phylogenetic relationships of the mitten crabs inferred from mitochondrial 16S rDNA partial sequences (Crustacea, Decapoda) [J]. *Acta Zoologica Sinica*, 2003, **49**(5): 592-599. [孙红英, 周开亚, 杨小军. 从线粒体16SrDNA序列探讨绒螯蟹类的系统发生关系 [J]. 动物学报, 2003, **49**(5): 592-599.]
- [13] Kienbaum K. Evolutionary transformations of the reproductive system in Eubrachyura (Crustacea: Decapoda) [D]. Beilin: Humboldt-Universität zu Berlin, 2019: 95-98.
- [14] Wang Q, Wang J, Wu Q, et al. Insights into the evolution of Brachyura (Crustacea: Decapoda) from mitochondrial sequences and gene order rearrangements [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021(170): 717-727.
- [15] Kobayashi G, Itoh H, Fukuda H, et al. The complete mitochondrial genome of the sand bubbler crab *Scopimera*

- globosa* and its phylogenetic position [J]. *Genomics*, 2021, **113**(1): 831-839.
- [16] Jia X N, Xu S X, Bai J, *et al.* The complete mitochondrial genome of *Somanniathelphusa boyangensis* and phylogenetic analysis of Genus *Somanniathelphusa* (Crustacea: Decapoda: Parathelphusidae) [J]. *PLoS One*, 2018, **13**(2): e0192601.
- [17] Liu Q N, Tang Y Y, Yang T T, *et al.* Phylogenetic relationships of Grapsoidea and insights into the higher phylogeny of Brachyuran [J]. *Genomics*, 2021, **113**(1): 429-439.
- [18] Yaghmour F, Naqbi H A. First record of Columbus crab *Planes minutus* (Crustacea: Decapoda: Brachyura: Grapsidae) Linnaeus, 1758 for the northwestern Indian Ocean [J]. *Marine Biodiversity Records*, 2020, **13**(1): 7.
- [19] Li Y T, Xin Z Z, Tang Y Y, *et al.* Comparative mitochondrial genome analyses of Sesamid and other Brachyuran crabs reveal gene rearrangements and phylogeny [J]. *Frontiers in Genetics*, 2020(11): 536640.
- [20] Xu J M. Molecular phylogeny of grapsoid crabs (Crustacea, Decapoda) based on partial sequences of mitochondrial 16S rRNA gene from China [J]. *Marine Sciences*, 2010, **34**(10): 13-17. [徐敬明. 中国沿海10种方蟹16S rRNA基因序列分析及系统发育研究 [J]. 海洋科学, 2010, **34**(10): 13-17.]
- [21] Gong L, Jiang H, Zhu K, *et al.* Large-scale mitochondrial gene rearrangements in the hermit crab *Pagurus nigrofascia* and phylogenetic analysis of the Anomura [J]. *Gene*, 2019(695): 75-83.
- [22] Gong L, Lu X T, Wang Z F, *et al.* Novel gene rearrangement in the mitochondrial genome of *Coenobita brevipennis* (Anomura: Coenobitidae) and phylogenetic implications for Anomura [J]. *Genomics*, 2020, **112**(2): 1804-1812.
- [23] Zhang Y, Gong L, Lu X, *et al.* Gene rearrangements in the mitochondrial genome of *Chiromantes eulimene* (Brachyura: Sesamididae) and phylogenetic implications for Brachyura [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020(162): 704-714.
- [24] Sun S, Jiang W, Yuan Z, *et al.* Mitogenomes provide insights into the evolution of Thoracotremata (Brachyura: Eubrachyura) [J]. *Frontiers in Marine Science*, 2022(9): 848203.
- [25] Zhang Z, Xing Y, Cheng J, *et al.* Phylogenetic implications of mitogenome rearrangements in East Asian potamidiscine freshwater crabs (Brachyura: Potamididae) [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2020(143): 106669.
- [26] Castellucci F, Luchetti A, Mantovani B. Exploring mitogenome evolution in Branchiopoda (Crustacea) lineages reveals gene order rearrangements in Cladocera [J]. *Scientific Reports*, 2022, **12**(1): 4931.
- [27] Zhang Y, Meng L, Wei L, *et al.* Different gene rearrangements of the genus *Dardanus* (Anomura: Diogenidae) and insights into the phylogeny of Paguroidea [J]. *Scientific reports*, 2021(11): 21833.
- [28] Cuesta J A, Guerao G, Schubart C D, *et al.* Morphology and growth of the larval stages of *Geograpsus lividus* (Crustacea, Brachyura), with the descriptions of new larval characters for the Grapsidae and an undescribed setation pattern in extended developments [J]. *Acta Zoologica*, 2011, **92**(3): 225-240.
- [29] Hartnoll R G. The Grapsidae and Ocypodidae (Decapoda: Brachyura) of Tanzania [J]. *Journal of Zoology*, 1975, **177**(3): 305-328.
- [30] Bernt M, Donath A, Jühling F, *et al.* MITOS: Improved *de novo* metazoan mitochondrial genome annotation [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2013, **69**(2): 313-319.
- [31] Chan P P, Lin B Y, Mak A J, *et al.* tRNAscan-SE 2.0: improved detection and functional classification of transfer RNA genes [J]. *Nucleic Acids Research*, 2021, **49**(16): 9077-9096.
- [32] Lowe T M, Chan P P. tRNAscan-SE On-line: integrating search and context for analysis of transfer RNA genes [J]. *Nucleic Acids Research*, 2016, **44**(W1): W54-W57.
- [33] Alikhan N-F, Petty N K, Ben Zakour N L, *et al.* BLAST Ring Image Generator (BRIG): simple prokaryote genome comparisons [J]. *BMC Genomics*, 2011(12): 402.
- [34] Zhang D, Gao F, Jakovlić I, *et al.* PhyloSuite: an integrated and scalable desktop platform for streamlined molecular sequence data management and evolutionary phylogenetics studies [J]. *Molecular Ecology Resources*, 2020, **20**(1): 348-355.
- [35] Ki J S, Dahms H U, Hwang J S, *et al.* The complete mitogenome of the hydrothermal vent crab *Xenograpsus testudinatus* (Decapoda, Brachyura) and comparison with brachyuran crabs [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 2009, **4**(4): 290-299.
- [36] Wang Z, Shi X, Guo H, *et al.* Characterization of the complete mitochondrial genome of *Uca lacteus* and comparison with other Brachyuran crabs [J]. *Genomics*, 2020, **112**(1): 10-19.
- [37] Wang Q, Tang D, Guo H, *et al.* Comparative mitochondrial genomic analysis of *Macrophthalmus pacificus* and insights into the phylogeny of the Ocypodoidea & Grapsoidea [J]. *Genomics*, 2020, **112**(1): 82-91.
- [38] Bai J, Xu S, Nie Z, *et al.* The complete mitochondrial genome of *Huananpotamon lichuanense* (Decapoda: Brachyura) with phylogenetic implications for freshwater crabs [J]. *Gene*, 2018(646): 217-226.
- [39] Xing Y H, Zhou H, Zou Y M, *et al.* First complete mitochondrial genome of *Lauridromia dehaani* and phylogenetic analysis of Brachyura [J]. *Journal of Nanjing Normal University (Natural Science Edition)*, 2021, **44**(1): 79-90. [邢雨辉, 周豪, 邹永梅, 等. 德汉劳绵蟹 (*Lauridromia dehaani*) 线粒体基因组测定及短尾下目系统发生分析 [J]. 南京师大学报(自然科学版), 2021, **44**(1): 79-90.]
- [40] Chen J, Xing Y, Yao W, *et al.* Phylomitogenomics confirm the phylogenetic position of the genus *Metaplex* inferred from the two grapsid crabs (Decapoda: Brachyura: Grapsoidea) [J]. *PLoS One*, 2019, **14**(1): e0210763.
- [41] Tsang L M, Schubart C D, Ah Yong S T, *et al.* Evolutio-

- nary history of true crabs (Crustacea: Decapoda: Brachyura) and the origin of freshwater crabs [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2014, **31**(5): 1173-1187.
- [42] Shahdadi A, Schubart C D. Taxonomic review of *Perisesarma* (Decapoda: Brachyura: Sesarmidae) and closely related genera based on morphology and molecular phylogenetics: new classification, two new genera and the questionable phylogenetic value of the epibranchial tooth [J]. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 2017, **182**(3): 517-548.
- [43] Gong L, Shi W, Si L Z, *et al.* Rearrangement of mitochondrial genome in fishes [J]. *Zoological Research*, 2013, **34**(6): 666-673. [龚理, 时伟, 司李真, 等. 鱼类线粒体DNA重排研究进展 [J]. 动物学研究, 2013, **34**(6): 666-673.]
- [44] Jiang L, Kang L, Wu C, *et al.* A comprehensive description and evolutionary analysis of 9 Loliginidae mitochondrial genomes [J]. *Hydrobiologia*, 2018, **808**(1): 115-124.
- [45] Froufe E, Bolotov I, Aldridge D C, *et al.* Mesozoic mitochondrial genome rearrangements and freshwater mussel (Bivalvia: Unionoidea) macroevolution [J]. *Heredity*, 2020, **124**(1): 182-196.
- [46] Lee T, Bae Y J, Shin S. Mitochondrial gene rearrangement and phylogenetic relationships in the Amphilepidida and Ophiacanthida (Echinodermata, Ophiuroidea) [J]. *Marine Biology Research*, 2019, **15**(1): 26-35.
- [47] Tan M H, Gan H M, Lee Y P, *et al.* ORDER within the chaos: insights into phylogenetic relationships within the Anomura (Crustacea: Decapoda) from mitochondrial sequences and gene order rearrangements [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2018(127): 320-331.
- [48] Wang S B, Huang C, Zou J X. Description of a new species of freshwater crab of the genus *Qianguiimon* Huang, 2018 (Crustacea: Decapoda: Brachyura: Potamidae) from Yulin, Guangxi, Southern China [J]. *Zoological Studies*, 2019(58): e31.
- [49] Kong X, Dong X, Zhang Y, *et al.* A novel rearrangement in the mitochondrial genome of tongue sole, *Cynoglossus semilaevis*: control region translocation and a tRNA gene inversion [J]. *Genome*, 2009, **52**(12): 975-984.

THE COMPLETE MITOCHONDRIAL GENOME OF *GRAPSUS ALBOLINEATUS* LATREILLE AND COMPARATIVE ANALYSIS OF GRAPSOIDEA

WEI Li-Ming, CHEN Jian, ZHANG Ying, LÜ Zhen-Ming and GONG Li

(Marine Science and Technology College, National Engineering Laboratory of Marine Germplasm Resources Exploration and Utilization, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China)

Abstract: For a long time, the phylogeny of Grapsoidea (Decapoda: Brachyura) has been controversial. Complete mitochondrial genome (mitogenome) provides important information for better understanding of gene rearrangement, molecular evolution and phylogenetic analysis. However, only a few mitogenomes of Grapsidae species have been reported and the phylogenetic status of Grapsidae within Grapsoidea remains unresolved. In order clarify the phylogenetic relationship of Grapsoidea and further explore the correlation between phygeny and mitogenome rearrangement, the complete mitogenome of *Grapsus albolineatus*, the representative species of Grapsidae was sequenced. The total length of this mitogenome is 15577 bp, containing 13 protein-coding genes, 22 transfer RNA genes, 2 ribosomal RNA genes and a control region. The nucleotide composition is shown as follows: 33.4% A, 12.0% G, 20.6% C, 34.0% T, respectively, with a high AT bias (67.4%). Majority protein-coding genes are initiated by the typical start codon ATN, with an exception GTG in *ATP8* and *ND1*, most of them terminate with TAN, while two genes (*COII* and *Cyt b*) use a single T as a stop codon. Leu (15.8%) and Cys (0.81%) are the most and least frequently used amino acid, respectively. Except for *tRNA-SerI*, which lacks DHU arm, all tRNAs have the typical cloverleaf structure. The phylogenetic relationships among Grapsoidea were reconstructed based on nucleotide sequences of 13 PCGs using maximum likelihood (ML) and Bayesian (BI) methods. The phylogenetic trees obtained identical topological structures, which showed that all grapsid crabs clustered into a clade, and *G. albolineatus* shared the closest relationship with *G. tenuicrustatus*. Sesarmidae and Xenograpsidae clustered together, and then formed a sister group with Gecarcinidae, and finally form a sister group with Grapsidae. Varunidae formed a separate clade. A significant correlation between gene rearrangement and phylogeny was found in Grapsoidea for the first time. These findings will contribute to a better understanding of gene rearrangement and molecular evolution, as well as provide insights into the phylogenetic studies of Grapsoidea.

Key words: Brachyura; Grapsidae; Mitochondrial sequence; Gene rearrangement; Phylogenetic analysis; *Grapsus albolineatus*