

# 甲殼類的分子生態學

施習德

## 目錄

甲殼類親緣分析所使用的分子特徵	生態環境的影響
粒線體 DNA 基因片段	分子行為生態研究
等位酶電泳	隱存種的問題
由遺傳生化特徵確認種類	引入種的問題
分子時鐘與地質事件	未來展望
分子時鐘與化石記錄	參考文獻

甲殼類屬於節肢動物門的甲殼動物亞門 (subphylum Crustacea)，全世界約有 2 萬 7 千多種。甲殼類不但有著引人的獨特外形，與我們的生活更是息息相關，包刮食用、餌料、環保、能源開發、藥用、健康等方面 (堵南山, 1993)。分類學是所有生物學的基礎，而親緣關係 (phylogeny) 又是分類學的骨架，因此親緣關係是甲殼動物學裡十分重要的一環。近年來，分子生物學的技術突飛猛進，提供了許多傳統形態分類無法突破的證據，也能夠強有力的檢驗舊有的分類系統，使其更加的完善合理。分子親緣關係 (molecular phylogeny) 所涵蓋的領域除了分類群的關係之外，也包括交配系統、族群遺傳結構、天擇影響、生物地理學等相關研究。

分子生態學 (molecular ecology) 為近年來一門嶄新的學科，由於具有不同研究背景的學者對此術語的解釋不同，至今尚未有一個明確的概念，但目前一般認為分子生態學是應用分子生物學的原理和方法來研究生命系統與環境系統相互作用的生態機理及其分子機制的科學，是生態學與分子生物學相互滲透而形成的一門交叉學科 (祖元剛等, 1999)。整理 *Molecular Ecology* 雜誌所發表論文題目的性質可知，分子生態學已經涵蓋了生物地理與親緣關係 (祖元剛等, 1999)，甚至已包含了生物的自然史 (natural history) 領域 (分類、演化、生態、行為)。

本文在此簡介甲殼類分子生態學的研究現況，期能提供給有興趣的讀者參考。

## 甲殼類親緣分析所使用的分子特徵

有關於親緣分析所使用分子特徵，早期多使用等位酶 (allozyme, 又稱同功酶 isozyme) 電泳技術，近年來由於 DNA 序列分析技術十分普及且簡易，利用此技術研究甲殼類親緣關係的報告也開始大量增加。有關於一些常用的分子生物技術在親緣關係上之應用，參見表 1。

### 粒線體 DNA 基因片段

在甲殼類的種間研究上，較常使用的兩個片段為 16S rRNA 與 COI (cytochrome oxidase I)，分述如下。

表 1、不同分子生物技術在系統分類問題上之應用 (修改自 Hillis *et al.*, 1996; 黃原, 1998)。

研究目的	等位酶 電泳	免疫血 清學	細胞遺 傳學	DNA 雜交	限制酶 分析	RAPD- PCR	序列分 析
<b>族群遺傳結構</b>							
雜合度	++	—	—	—	+	—	0
地理變異	++	—	0	—	++	+	\$
關聯程度	0	—	—	—	+	+	\$
<b>分類學研究</b>							
物種界線	+	+	++	—	+	+	\$
雜交	++	—	++	—	+	+	0
<b>親緣關係</b>							
0-5 百萬年前	++	0	0	0	+	+	++
5-50 百萬年前	+	++	++	+	+	+	++
50-500 百萬年前	0	0	0	0	0	0	++
500-3500 百萬年前	—	—	—	—	—	—	++

註: — 不適合; 0 勉強; \$ 適合但昂貴; + 適合有效; ++ 最有效

16S DNA (圖 1) 為 mtDNA 上一構造性的非編碼 (non-coding) 基因，其 16Sar 和 16Sbr 引子 (primers) 之間約 520 bp 的片段為甲殼類系統分類學上最廣為使用的。此外，Crandall 等人所使用的 1471 和 1472 引子之間的 16S 基因片段，相較於傳統的 16Sar 和 16Sbr 片段，1471-1472 在 3' 端多了約 20 個有較多變異的片段 (Schubart *et al.*, 2000)，也十分適合於無脊椎動物。

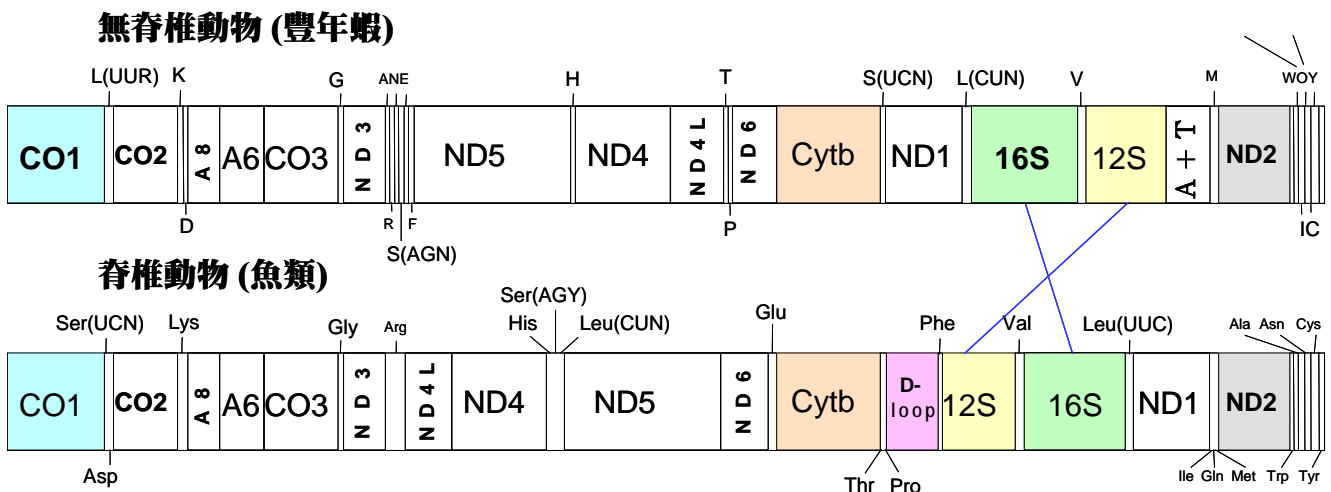


圖 1、無脊椎動物 (豐年蝦 *Artemia*) 與脊椎動物 (魚類) 之 mtDNA 基因排列比較 (修改自 Staton *et al.*, 1997)。

COI (cytochrome oxidase I) (圖 1) 則為 mtDNA 上的編碼 (coding) 基因，亦廣泛使用於甲殼類的親緣分析上 (Schubart *et al.*, 1998a; Chu *et al.*, 1999; Harrison & Crespi, 1999)，其中使用 COIa 和 COIf 引子所夾出約 640 bp 的片段為甲殼類研究上較常使用的。由於 COI 片段的變異性比 16S 大兩倍之多 (Schubart *et al.*, 1998a; Chu *et al.*, 1999)，因此對於相近種類、甚至族群之間的遺傳變異，將具有較佳的解析度。

## 等位酶電泳

等位酶電泳 (allozyme electrophoresis) 對族群的雜合度 (heterozygosity)、地理變異 (geographic variation)、物種界線 (species boundaries)、雜交 (hybridization)、以及 0 至 50 百萬年的親緣關係是適合且有效率的 (表 1)，因此仍廣泛應用於系統分類學的研究上。特別是，由於無脊椎動物的 16S rRNA 和 COI 的變異度不高，大多僅用於種間或屬間的比較研究；但在探討無脊椎動物族群遺傳結構時，由於尚未找出如脊椎動物變異性極高的 D-loop DNA 控制區部位，因此仍採用等位酶或以限制酶片段 (restriction fragment) 分析的方法 (表 1)，同時此法可迅速分析大量的族群遺傳樣品，在無脊椎動物方面仍有其應用價值。

在此簡述等位酶電泳方法如下。由冰凍或新鮮標本中摘取組織，加入萃取緩衝液於超音波研磨器上均質化，離心，以濾紙片沾萃取液，插入已製好的澱粉凝膠 (starch gel) 一端，在電泳槽上以 4 °C 進行電泳，一段時間後將凝膠切成數片薄片，浸於欲分析酵素的染劑中，待凝膠顯色，拍照或記錄顯示的酶譜 (zymogram) (圖 2)。每一片凝膠可放置數十個濾紙片一起電泳，而每片凝膠又可切成數片薄凝膠，以不同酵素的染色劑染色，因此利用等位酶方法可大量迅速分析族群遺傳特徵。相較於 DNA 序列實驗，等位酶電泳的儀器耗材較為便宜，是一項非常實用的族群分析方法。通常每一族群以 30 個個體、15-20 種酵素分析最佳。判斷此酵素的結構性質 (單體 monomer、二聚體 dimer、或 tetramer 四聚體等)，記錄每個個體的等位基因頻率，於軟體 (例如 *Biosys*) 中分析，再由遺傳距離求取親緣關係樹。

然而等位酶分析的結果較容易受到環境的影響而有所變化，例如溫度、食物成分等，因此難以提供其他研究人員參考比對，同時必須採用新鮮或冷凍標本，對於跨國性的研究困難度較高。

## 由遺傳生化特徵確認種類

傳統上，要訂定一個新種，僅須找出足以分離兩類群體的外形特徵即可，並不須解釋這類的差異是否達到種間的程度；更有甚者，某些分類學家會僅以一兩個個體的微小差異即訂定新種，此即採用「模式種」的觀念 (typological species concept) (Mayr & Ashlock, 1991)。事實上，許多物種的族群間、甚至個體間 (不同性別、變態體、變異體等) 都存在著變異，訂定一個新種必須有足夠的嚴謹度，至少檢視過一系列標本，才能較合理的涵蓋各類變異，否則即落入眾矢之的的「細分者」(splitter, Mayr & Ashlock, 1991)。為減少這種現象，現今生物分類命名中已增加十多種的模式標本類型，包括正模、副模、配模、新模、地模等，共有 18 類之多，以期反映物種的真實特徵 (同號文, 1995)。

這種細分的現象，在淡水動物 (圖 3) 的分類上特別嚴重，主要原因是淡水環境的多樣性不高 (因此天擇壓力變異小，造成形態特徵分化程度低)，但各淡水環境之間又存在許多明顯的隔離機制 (山系、河系都可能造成種化)，因此淡水動物學家常基於些許細微的形態差異就訂定許多新種，使得一般研究人員無法清楚的辨認種類，阻礙了其他領域的研究。事實上，河川襲奪的現象在地質史上不斷發生，某些物種的遷移能力也超出我們所能想像，淡水生物分類學家必須以更嚴謹的態度來確認種類，這不單是為了個人的學術聲譽，也為了其他研究得以同步的深入研究淡水生物自然史。

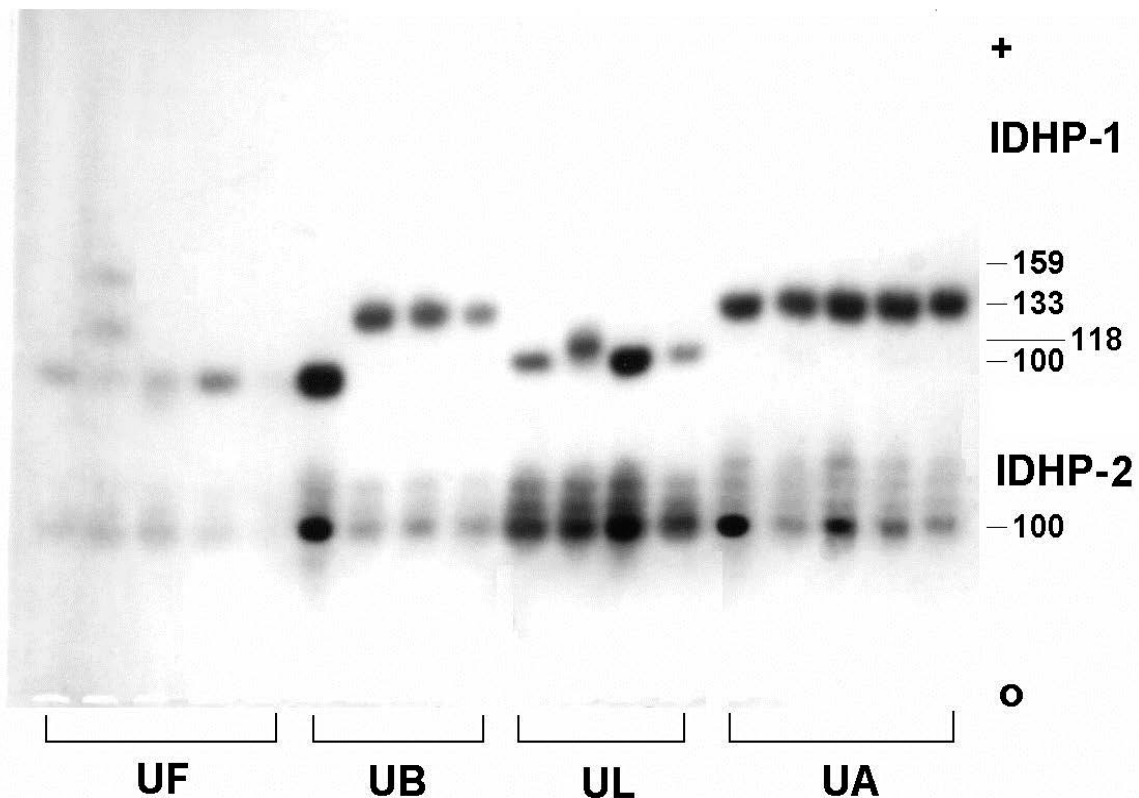


圖 2、四種招潮蟹 (UF, 台灣招潮 *Uca formosensis*; UA, 弧邊招潮 *U. arcuata*; UB, 北方呼喚招潮 *U. vocans borealis*; UL, 清白招潮 *U. lactea lactea*) 鰓組織之異檸檬酸去氫酶 (IDHP) 譜帶表現。

除了釐清這些細微形態差異在族群內是否足夠穩定之外，許多淡水甲殼類分類學家為保險起見，已開始採用分子遺傳的證據以支持所訂定的新種。例如南非的 Stewart 與 Daniels 實驗室的成員運用等位酶證據，支持他們所發表的一系列新種淡水蟹 (例如 Daniels *et al.*, 1998; Stewart & Cook, 1998)；而 Schubart *et al.* (1998b) 也應用 16S rRNA 片段支持所發現的牙買加新種淡水蟹 (*Sesarma ayatum*)。

在海洋甲殼類方面，包括 *Carcinus*, *Menippe*, *Sesarma*, *Brachynotus*, *Scylla*, *Callinectes* 等都已已有報告指出分生特徵能夠清楚的確認種類，以補形態之不足。在此舉出兩例說明。

鋸緣青蟬 (*Scylla serrata*) 我們通稱紅蟬，是很常見的食用梭子蟹類，長久以來我們均認為僅有一屬一種，雖然漁民早已指出內含不同的種類，但學界一般認為只是個體間的顏色變異，不應分為不同種。但近年來，澳洲的 Keenan 等人 (1998) 利用等位酶、16S rRNA、COI 的分子特徵，確認了這四種青蟬 (*S. serrata*、*S. olivacea*、*S. paramamosain*、*S. tranquebarica*) 的形態特徵都具有遺傳的基礎，還原了當初命名者的種名。

美青蟹 (*Callinectes*) 為分布於熱帶與亞熱帶美洲的重要經濟性蟹類，熱帶西大西洋已記錄有 9 種，其中馬拉開波美青蟹 (*C. maracaiboensis*) 為 1969 年發表於南美委內瑞拉馬拉開波瀉湖的新種蟹類，後來也在加勒比海和巴西被發現，但由於與其他種類的形態差異過於模糊，因此 Schubart *et al.* (2001) 利用 16S rRNA 的序列證實此蟹其實是一無效種，為常見種 *C. bocourti* 的同物異名！





圖 3、淡水蟹的形態差異極小，目前多加入分子生物證據以檢驗不同分類群之間的遺傳隔離。圖為廣布於高屏山區溪澗中的蔡氏澤蟹 (*Geothelphusa tsayae*)。

## 分子時鐘與地質事件

目前欲推估生物演化的時間證據，僅有化石、生物地理、分子特徵三類數據 (黃原, 1998)，然而分子時鐘 (molecular clocking 或分子定年 molecular dating) 有許多的假設與不足之處，若能由化石與生物地理證據尋求支持，將會更具有說服力。在分子時鐘的研究上，最常用的地質年代為巴拿馬地峽 (Panama Isthmus) 的封閉年代 (約 3.1 百萬年前)，因此地峽兩側海洋物種的隔離應該至少有三百萬年。由這個確定的年代，比較兩類物種的遺傳距離，假設分化速率 (divergence rate) 是一致的，就可以推斷出每一百萬年物種的分化速

率，以此速率則可推估其他相似物種的分化年代。

例如 Sturmbauer *et al.* (1996) 推估招潮蟹的 16S rRNA 分化速率為每百萬年 0.9%；Schubart *et al.* (1998a) 估計牙買加的海域相手蟹類 (*Sesarma*) 的 16S rRNA 為 0.65%，COI 為 1.66%；陸域相手蟹類為 0.88%，COI 為 2.33%，顯然陸域環境的隔離機制效果大於海洋環境；此外，Knowlton *et al.* (1993) 估計巴拿馬槍蝦的 COI 為 2.2-2.6%。然而，Stillman & Reeb (2001) 對異尾類的岩瓷蟹類 (*Petrolisthes*) 所做的估計則有較大的變異範圍 (0.53-1.36%)。

## 分子時鐘與化石記錄

甲殼類由於具有幾丁質的外骨骼，質地堅硬，因此常能在地層中保存下來 (圖 4)。最早的甲殼類化石出現在古生代的寒武紀 (註：近年來已有報導發現前寒武紀的甲殼類化石)，而我們熟知的大型十足類 (蝦、蟹、寄居蟹) 化石更是常見於許多地層當中。其中短尾類 (即蟹類) 的最早化石出現在侏羅紀，多屬於綿蟹派 (section Dromiacea) 蟹類；白堊紀則包含真蟹派 (section Eubrachyura) 的早期分化群，特別是異孔亞派 (Subsection Heterotramata)；而現今蟹類的輻射演化，特別是胸孔亞派 (subsection Thoracotremata)，則起始於始新世 (Schram, 1986)。至於淡水蟹則是在第三紀末的上新世以後才有化石的出現 (Ng & Rodriguez, 1995)。

除了由地質事件來檢驗或支持分子時鐘之外，也能夠使用化石年代當作證據。化石的年代可由所存在的地層年代來判斷，也可以直接測定化石的年代 (例如放射性物質的衰減程度)。若現生種類有可信賴的化石記錄年代，則能較準確的了解物種親緣關係與生物地理的相關研究。例如 Harrison & Crespi (1999) 探討廣泛分布於太平洋與大西洋的黃道蟹屬 (genus *Cancer*) 之親緣關係，使用 COI 與形態數據建立親緣樹，並用其化石年代加以檢驗。

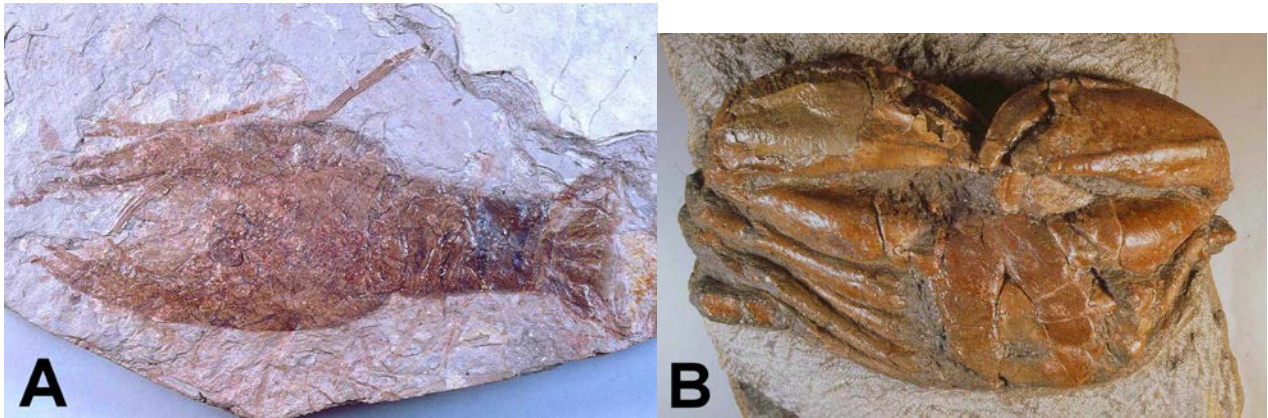


圖 4、化石是檢驗物種分化年代十分有用的證據，但必須確定其發現的地層年代。圖 A 為白堊紀的中國蝦類化石；圖 B 為嘉義觸口所發現的蟹類化石。標本由國立自然科學博物館程延年博士所提供。

## 生態環境的影響

目前有關甲殼類的分子親緣關係多偏重於親緣地理學 (phylogeography) 的研究，有關生態天擇壓力造成遺傳分化的研究報告並不多，僅舉一例說明。此為 Schubart *et al.* (1998a) 針對牙買加產非海洋性蟹類所做的分子親緣研究，使用 16S rRNA 與 COI 兩基因片段。

牙買加有許多十分特殊的陸生蟹與淡水蟹，由於棲息環境迥異 (例如洞穴、溪流、碎石、鳳梨科植物葉腋、蝸牛殼內)，因此造就出許多特殊的物種。不同的環境也產生不同形態適應的蟹類，例如扁平體型的 *Metopaulias depressus* 就適合鑽入鳳梨科植物的葉腋中。此外，親代的撫育行為對於環境的適應也有很大的關係，例如 *M. depressus* 演化成縮短型不進食的幼體期，雌蟹將子代產於鳳梨科植物充滿水的葉腋中，除了會協助移除垃圾碎屑之外，雌蟹也會循環水流供應子代氧氣，甚至會帶來空蝸牛殼放入葉腋的水中，以補充鈣質並充當酸鹼緩衝液 (pH buffer)；此外，雌蟹也會保護子代抵擋敵人，例如豆娘的若蟲和蜘蛛。*Sesarma jarvisi* 則將子代產於空蝸牛殼內，雌蟹會將蝸牛殼倒立以盛接雨水或將水帶入殼內。這兩種雌蟹都會餵食子代，餵食時間長達數個月。由 Schubart 等人所得的分子親緣關係，並結合地質事件，顯示相手蟹類是在 3.4 百萬年前入侵牙買加的陸域和淡水棲地的，而在上新世後期 (Late Pliocene, 約 3.4-1.9 百萬年前) 才有快速的適應性輻射演化的 (圖 5)，這與地質事件造成多樣的棲息環境與演化出親代的撫育行為有很重要的關聯，在長期的隔離下，演化出許多不同的種類。

## 分子行為生態研究

Kitaura *et al.* (1998) 利用 12S 至 16S rRNA 的 mtDNA 片段探討沙蟹科中毛帶蟹亞科 (subfamily Dotillinae) 之類源關係，使用猴面蟹 (Camptandriinae) 亞科當作姊妹群 (sister group)，而沙蟹亞科當作外群 (outgroup)。結果顯示毛帶蟹亞科的成員是單源的 (monophyletic)，但泥蟹屬 (genus *Ilyoplax*) 的親緣關係卻是多源的 (polyphyletic)，共可分為三個譜系 (lineages) (圖 6 左)。此外，由於毛帶蟹亞科蟹類有不同的「使用泥塊領域行為」 (mud-using territorial behavior)，包括洞口堵塞 (burrow plugging)、路障建造 (barricade



building)、籬笆建造 (fence building) (參見圖 5 右下方圖示)，尤以泥蟹屬成員表現最多樣化。以簡約法則分析此行為特徵的親緣關係 (圖 6 右)，顯示此行為特徵在泥蟹屬內也是多次連續演化的，由此親緣樹可得出以下的演化順序：「洞口堵塞」最為原始，之後演化成「路障建造」，最後演化成「籬笆建造」。由圖 6 可得知行為特徵的演化關係與分子特徵的演化是能夠互相支持的。

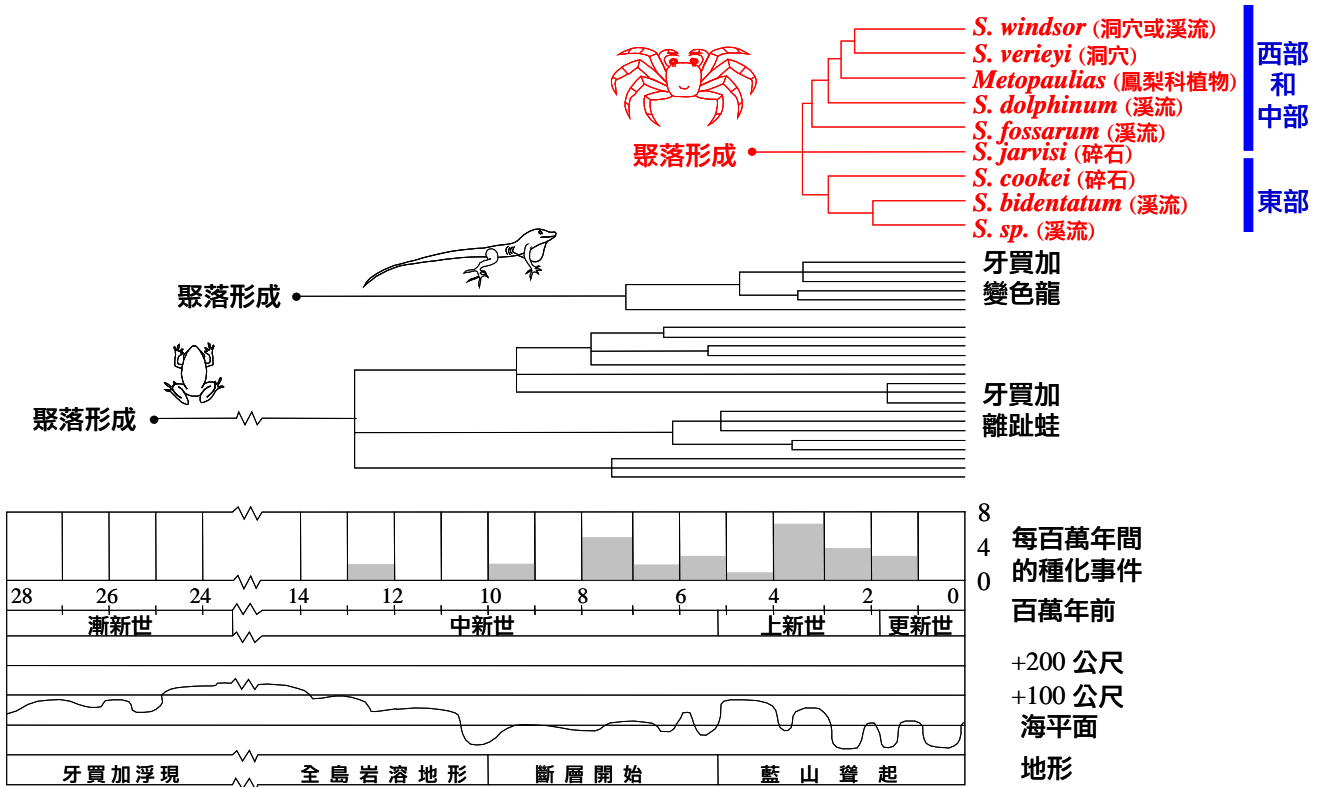


圖 5、九種牙買加陸蟹的親緣關係與適應性輻射演化，以及基於分子時鐘所估算的分化時間。此外，並加入牙買加蜥蜴 (變色龍 *Anolis*) 和蛙類 (離趾蛙 *Eleutherodactylus*) 之親緣樹當作分化時間的比較。直條圖表示此三類動物每百萬年間的種化事件總數，海平面改變亦顯示於圖上 (修改自 Schubart *et al.*, 1998a)。

此外，Kitaura *et al.* (2002) 亦利用 12S 至 16S rRNA 的基因以及揮舞展示 (waving display)、交配系統 (mating systems) 的差異，判斷澳洲的「日本大眼蟹」(*Macrophthalmus japonicus*) 應該為一獨立的新種；而韓國與日本的萬歲大眼蟹 (*M. banzai*) 也可能是不同的種或亞種。

## 隱存種的問題

在某些情況之下，不同族群間的隔離已經達到種間的地步 (可由其遺傳距離差異判斷)，但也許其生存的生態環境壓力仍然相同，造成外部形態特徵不見得反應他們的隔離，這就是隱存種 (cryptic species) 的問題。在甲殼類方面，這類現象的發現已逐漸增多。此時，分類學家通常會絞盡腦汁試圖尋找這些族群是否有微小的穩定差異，幸運的話，就可能找到足以支持新種的形態特徵。例如 Schubart *et al.* (1998b) 基於 16S rRNA 的差異，在尋找出形態

的特徵之後，將牙買加的 *Sesarma bidentatum* 分離出一新種 *S. ayatum*。若是無法找出形態的差異，也只能暫時不加以描述新種，例如墨西哥灣的相手蟹 (*Sesarma reticulatum*)、對蝦 (*Penaeus* spp.)、龍蝦 (*Panulirus argus*)；在其他節肢動物，例如蜘蛛 (*Aptostichus simus*, *Nesticus* spp.) 也發現此類現象。

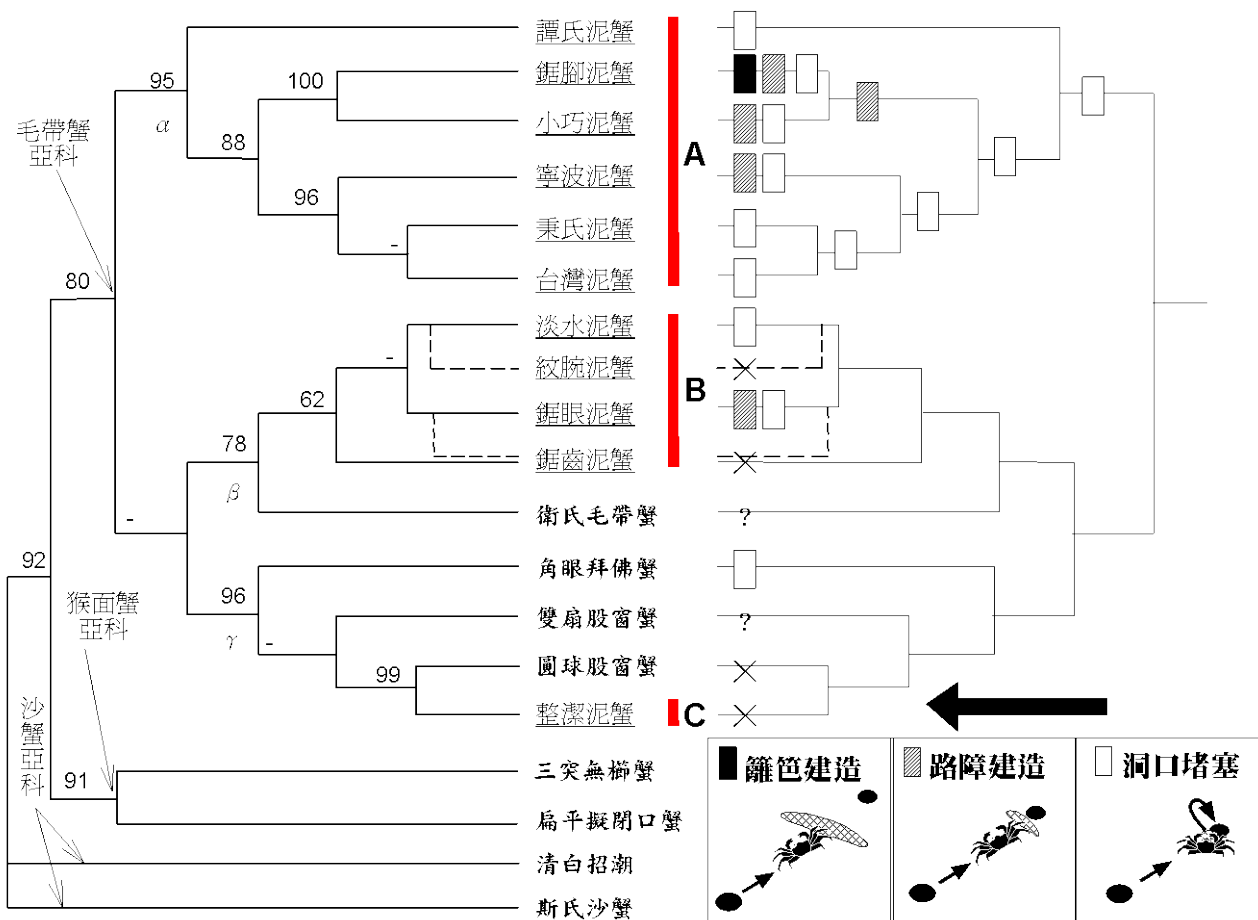


圖 6、左：根據 1416 個 12S 到 16S rRNA 鹼基序列所繪製的 15 種毛帶蟹亞科（包含泥蟹屬 [有底線者]、毛帶蟹屬、拜佛蟹屬、股窗蟹屬）之親緣樹（極似然樹, maximum-likelihood tree）。猴面蟹亞科當作姊妹群，而沙蟹亞科當作外群。虛線表示此位置乃由另一分析所得；每一分支的數字表示統計上可信賴的百分比，(-) 則表示統計上是不顯著的； $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  表示另一分析所得之同樣的分支群 (clade)，A, B, C 表示所得泥蟹的三個譜系。右：毛帶蟹亞科蟹類使用泥塊的領域行為（以矩形框表示，圖示於右下方），以簡約法則所構成的極似然樹。X 與 ? 表示缺乏或未知泥塊領域行為（修改自 Kitaura *et al.*, 1998）。

## 引入種的問題

物種出現於某一地區並非全然由於自然的因素，例如擴散 (dispersal) 或隔離分化 (vicariance)，人為或非人為的引入物種也是我們在解釋親緣地理因子時必須注意到的。甲殼類的外來種問題，尤以淡水產的種類特別嚴重。

例如俗稱大閘蟹的中華絨螯蟹，原本產於中國大陸，具有洄游的習性，幼體必須在河口附近度過浮游時期。在航運發達以後，停靠吳淞江口的輪船抽取壓艙水時，連帶抽進大閘蟹的幼體，因此隨著輪船遠渡重洋在德國定居，幾十年來，已經分布到北歐了 (劉瑞玉, 1976)。然而，更嚴重的問題在於絨螯蟹是具有高經濟價值的水產物，養殖戶從其他地區引





圖 7、僅有一屬一種的椰子蟹 (*Birgus latro*) 雖然廣泛分布於印度-西太平洋的熱帶島嶼上，各地的族群仍有一定的遺傳隔離，然而走私來台放生後，已經打亂本地的族群遺傳結構。

入種苗養殖以滿足人們的大量需求，此舉已完全打亂了原本的分布型式。台灣的絨螯蟹類有兩種，一是俗稱毛蟹的日本絨螯蟹，另一是俗稱青毛蟹的台灣扁絨螯蟹，基本上兩前者在台灣西部，後者在台灣東部。由於飽含膏黃的繁殖期各自不同，蟹販很容易載運東部的青毛蟹至西部販售，逃逸或瘦小被丟棄的可能性無法排除，也許這就是近年來在西部發現青毛蟹的原因。

淡水澤蟹雖非經濟食用種，但也難逃商販的魔掌，目前已在高雄市區發現有攤販販售疑似屏東所產的澤蟹供小朋友飼養把玩，逃逸而定居的機率極高。

淡水蝦類也有類似問題，例如原產於美國西南的克氏原螯蛄（俗稱美國螯蝦）與原產於泰國的羅氏沼蝦（俗稱泰國蝦），都是台灣溪流常見的外來種蝦類。

屬於異尾類的椰子蟹（圖 7）也潛藏著外來種的問題，據悉由於椰子蟹是保育類動物，在海關沒入走私的椰子蟹時，均於墾丁國家公園的龍坑保護區放生，雖然椰子蟹在印度-西太平洋均屬同種，但外來族群的基因勢必打亂台灣椰子蟹的族群遺傳結構。然而，由於台灣從未研究過椰子蟹的族群遺傳，因此影響的程度勢必永遠不得而知。

## 未來展望

在甲殼類方面，目前已有成果或正在進行的分子親緣地理研究，包括絨螯蟹類（中華絨螯蟹 *Eriocheir sinensis*，日本絨螯蟹 *E. japonica*，合浦絨螯蟹 *E. hepuensis*，狹顎新絨螯蟹 *Neeriocheir leptognathus* 和台灣扁絨螯蟹 *Platyriocheir formosa*）的分子親緣關係；以及台灣與東亞島嶼淡水蟹（澤蟹屬 *Geothelphusa*、清溪蟹屬 *Candidiopotamon*）與淡水蝦（沼蝦屬 *Macrobrachium*）的親緣地理學。

正如前述，對於形態差異極小的淡水蝦蟹類，未來應傾向以利用遺傳證據支持形態差異的態度來從事研究。在遺傳證據方面，除了 16S rRNA 與 COI 之外，也應嘗試找出更多適宜的基因片段來佐證，例如已應用於其他動物的 ITS-1 (first internal transcribed spacer)。

深海蝦蟹的親緣地理是另一個值得探討的主題，除了採集標本獲得 DNA 序列以瞭解解種間的親緣關係之外，配合地質事件、洋流、地形、生活史等因素的探討，將有助於釐清深海物種的種化 (speciation) 與生物多樣性的問題。

## 參考文獻

- 同號文, 1995。有關物種概念與劃分中的一些問題。古生物學報 34: 761-776。
- 堵南山, 1993。甲殼動物學。科學出版社, 北京。
- 黃原, 1998。分子系統學—原理、方法及應用。中國農業出版社, 北京。
- 祖元剛、孫梅、康樂 主編, 1999。分子生態學理論、方法和應用。高等教育出版社, 北京。
- 劉瑞玉, 1976。十足類簡介。科學普及出版社, 北京。
- Chu, K. H., J. Tong & T.-Y. Chan, 1999. Mitochondrial cytochrome oxidase I sequence divergence in some Chinese species of *Charybdis* (Crustacea: Decapoda: Portunidae). *Biochem. Syst. Ecol.* 27: 461-468.
- Daniels, S. R., B. A. Stewart & M. J. Gibbons, 1998. *Potamonautes granularis* sp. nov. (Brachyura, Potamonautidae), a new cryptic species of river crab from the Olifants River system, South Africa. *Crustaceana* 71: 885-903.
- Harrison, M. K. & B. J. Crespi, 1999. Phylogenetics of *Cancer* crabs (Crustacea: Decapoda: Brachyura). *Mol. Phylogenet. Evol.* 12: 186-199.
- Hillis, D. M., C. Moritz & B. K. Mable, 1996. *Molecular Systematics*. 2nd edition. In: Sinauer Associates Inc., Massachusetts, U.S.A.
- Keenan, C. P., P. J. F. Davie & D. L. Mann, 1998. A revision of the genus *Scylla* de Haan, 1833 (Crustacea: Decapoda: Brachyura: Portunidae). *Raffles Bull. Zool.* 46: 217-245.
- Kitaura, J., M. Nishida & K. Wada, 2002. Genetic and behavioral diversity in the *Macrophthalmus japonicus* species complex (Crustacea: Brachyura: Ocypodidae). *Mar. Biol.* 140: 1-8.
- Kitaura, J., K. Wada & M. Nishida, 1998. Molecular phylogeny and evolution of unique mud-using territorial behavior in ocypodid crabs (Crustacea: Brachyura: Ocypodidae). *Mol. Biol. Evol.* 15: 626-637.
- Knowlton, N., L. A. Weigt, L. A. Solórzano, D. K. Mills & E. Bermingham, 1993. Divergence in proteins, mitochondrial DNA, and reproductive compatibility across the Isthmus of Panama. *Science* 260: 1629-1632.
- Mayr, E. & P. D. Ashlock, 1991. *Principles of Systematic Zoology*. In: McGraw-Hill Inc., New York.
- Ng, P. K. L. & G. Rodriguez, 1995. Freshwater crabs as poor zoogeographical indicators: a critique of Banarescu (1990). *Crustaceana* 68: 636-645.
- Schram, F. R., 1986. *Crustacea*. Oxford University Press, New York.
- Schubart, C. D., R. Diesel & S. B. Hedges, 1998a. Rapid evolution to terrestrial life in Jamaican crabs. *Nature* 393: 363-365.
- Schubart, C. D., J. Reimer & R. Diesel, 1998b. Morphological and molecular evidence for a new endemic freshwater crab, *Sesarma ayatum* sp. n., (Grapsidae, Sesarminae) from eastern Jamaica. *Zool. Scrip.* 27: 373-380.
- Schubart, C. D., J. E. Neigel & D. L. Felder, 2000. Use of the mitochondrial 16S rRNA gene for phylogenetic and population studies of Crustacea. *Crust. Issues* 12: 817-830.
- Schubart, C. D., J. E. Conde, C. Carmona-Suárez, R. Robles & D. L. Felder, 2001. Lack of divergence between 16S mtDNA sequences of the swimming crabs *Callinectes bocourti* and *C. maracaiboensis* (Brachyura: Portunidae) from Venezuela. *Fish. Bull.* 99(3): 475-481.
- Staton, J. L., L. L. Daehler & W. M. Brown, 1997. Mitochondrial gene arrangement of the horseshoe crab *Limulus polyphemus* L.: conservation of major features among arthropod classes. *Mol. Biol. Evol.* 14: 867-874.
- Schubart, C. D., J. E. Conde, C. Carmona-Suárez, R. Robles & D. L. Felder, 2001. Lack of divergence between 16S mtDNA sequences of the swimming crabs *Callinectes bocourti* and *C. maracaiboensis* (Brachyura: Portunidae) from Venezuela. *Fish. Bull.* 99: 475-481.
- Stewart, B. A. & P. A. Cook, 1998. Identification of a new species of river crab (Decapoda: Brachyura: Potamonautidae) from South Africa using morphological and genetic data. *J. Crust. Biol.* 18: 556-571.
- Stillman, J. H. & C. A. Reeb, 2001. Molecular phylogeny of Eastern Pacific porcelain crabs, genera *Petrolisthes* and *Pachycheles*, based on the mtDNA 16S rDNA sequence: phylogeographic and systematic implications. *Mol. Phylogenet. Evol.* 19: 236-245.
- Sturmbauer, C., J. S. Levinton & J. Christy, 1996. Molecular phylogeny analysis of fiddler crabs: test of the hypothesis of increasing behavioral complexity in evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 10855-10857.