

# 东南沿海小孔蛸(*Cistopus* sp.)线粒体序列的比较研究\*

杨秋玲<sup>1,2</sup> 林祥志<sup>1</sup> 郑小东<sup>3</sup> 苏永全<sup>2</sup>

(1. 国家海洋局第三海洋研究所 厦门 361005; 2. 厦门大学海洋与环境学院 厦门 361005;  
3. 中国海洋大学水产学院 青岛 266003)

**提要** 采用线粒体 DNA 16S rRNA 和 CO<sub>1</sub> 基因序列对福建、浙江沿海分布的 5 个小孔蛸(*Cistopus* sp.)群体进行了遗传多样性研究。结果表明, 序列总长度分别为 497—501bp (16S rRNA)和 652bp (CO<sub>1</sub>); 小孔蛸 5 个群体的序列碱基组成均显示出较高的 A+T 含量(16S rRNA 基因 72.1%, CO<sub>1</sub> 基因 65.9%)。16S rRNA 基因片段在种内和群体间个体差异均较小, 5 个群体共检测到 8 个变异位点(其中 7 个插入/缺失位点); CO<sub>1</sub> 基因序列不存在插入/缺失位点, 群体内个体间变异位点数为 21 个。系统进化树表明, 宁德群体和象山群体与其它三个群体的亲缘关系较远, 但存在基因交流。线粒体 16S rRNA 和 CO<sub>1</sub> 基因在群体间无显著多态性分布。

**关键词** 小孔蛸, 线粒体 DNA, 16S rRNA 基因, CO<sub>1</sub> 基因

**中图分类号** Q959.216

头足类(cephalopods)遍布世界各大洋, 有记载的生活种有 700 多种(董正之, 1987; 郑玉水等, 1987; ITIS, 2001<sup>1)</sup>), 由于过度捕捞, 一些重要经济物种, 特别是近岸种类的产量在过去 20 年来急剧下降。国际市场对头足类的需求却有增无减, 供求关系的严重失衡使得头足类的养殖作为资源恢复的重要手段受到广泛关注, 蛸类则成为头足类中最受关注的养殖对象之一(林祥志等, 2006)。小孔蛸(*Cistopus* sp.)隶属蛸科(Octopodidae)、小孔蛸属(*Cistopus*), 是一种我国东南沿海底栖型重要经济头足类, 俗称“章鱼”、“望潮”, 其肉质细嫩、营养丰富、味道鲜美, 是东南沿海地区传统名点小吃, 也深受港澳台同胞和海外侨胞欢迎。由于其风味独特, 市场上供不应求, 加上该种经济价值高, 生长快, 养殖周期短(通常为 8—10 个月), 当年即可上市, 因此, 是理想的增养殖品种。

目前, 无序采捕使得小孔蛸资源量衰减严重, 增

养殖研究正逐步开展起来。不过我国沿海现存群体仍为野生型, 本文通过线粒体(mtDNA)16S rRNA 和 CO<sub>1</sub> 基因序列测定和比较分析, 研究了福建、浙江沿海分布的 5 个小孔蛸群体的遗传结构和分化状况, 以期能为该种的种质鉴定、资源保护、养殖与育种管理提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料来源

实验用小孔蛸样品于 2007 年 6—11 月分别采自浙江象山(XS)和温岭(WL), 福建宁德(ND)、莆田(PT)和厦门(XM)(图 1, 表 1)。所有个体(共 126 个)活体取样, 取口球肌组织浸泡于 95%乙醇中, -20℃ 保存。

### 1.2 总 DNA 提取

参考《分子克隆实验指南》(Sambrook *et al*, 1989)的酚/氯仿抽提法, 略有修改。随机选取上述 5 个群体

\* 国家“863”项目资助, 2007AA09Z433 号; 福建省科技重大专项前期项目资助, 2005NZ1011 号。杨秋玲, E-mail: yangql0712@163.com

1) ITIS (Integrated Taxonomic Information System), 2001. <http://www.itis.usda.gov>

通讯作者: 林祥志, 副研究员, E-mail: lxz8848@263.net

收稿日期: 2008-08-16, 收修改稿日期: 2008-12-19

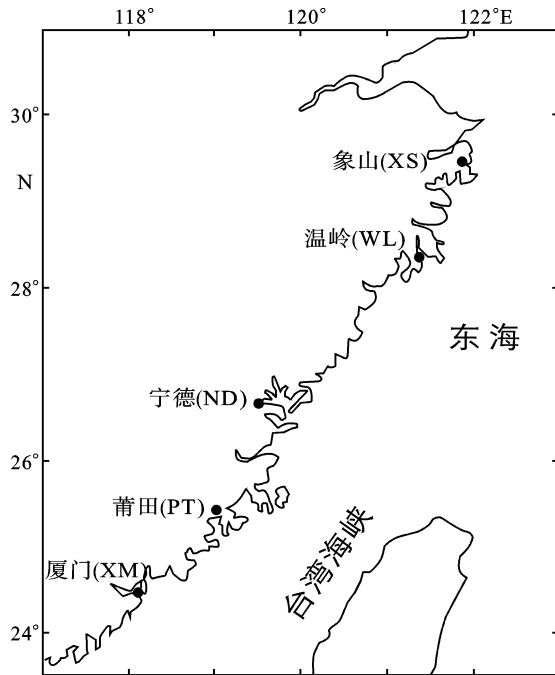


图 1 小孔蛸的采样地点

Fig.1 Location of *Cistopus* sp. collected in the coastal waters of China

的小孔蛸口球肌标本各 20 只, 分别剪取 15—20mg 肌肉于 1.5ml 离心管中剪碎, 加入 600 $\mu$ l DNA 抽提缓冲液和 3 $\mu$ l 蛋白酶 K, 55 $^{\circ}$ C 水浴消化 2h, 其间不定时摇动离心管数次, 直至消化液澄清, 加入酚: 氯仿: 异戊醇 = 25: 24: 1 (V/V/V) 溶液 600 $\mu$ l, 轻轻来回颠倒离心管 10min, 12000r/min 离心 10min。取上层水相用等体积上述酚氯仿再抽提, 直至水相与有机相之间没有白色沉淀, 再用氯仿抽提一次。最后的上清液用两倍体积预冷的无水乙醇沉淀 DNA, 颠倒混匀, 4 $^{\circ}$ C 静置 20min, 12000r/min 离心 10min, 沉淀再用 70% 乙醇洗涤。离心晾干沉淀后加 50 $\mu$ l 无菌水 4 $^{\circ}$ C 溶解过夜。-20 $^{\circ}$ C 保存。

### 1.3 PCR 扩增及产物测序

引物序列参考 Anderson(2000)。PCR 反应总体系为 25 $\mu$ l, 含 2.0mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.2mmol/L dNTPs 混

合液, 0.2 $\mu$ mol/L 每种引物, 1 $\mu$ l DNA 模板, 1U *Taq* 酶 (TAKARA), 2.5 $\mu$ l 10 $\times$ 缓冲液。PCR 反应程序为 94 $^{\circ}$ C 预变性 2min, 94 $^{\circ}$ C 变性 45s, 46 $^{\circ}$ C 退火 1min (COI), 72 $^{\circ}$ C 延伸 1min, 共 30 个循环, 最后一个循环结束后 72 $^{\circ}$ C 再延伸 5min。每次反应均设不含模板 DNA 的空白对照。PCR 产物用含有 GeneFinder 的 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测、拍照。纯化后 ABI377 测序仪双向测序(深圳华大基因公司)。

### 1.4 序列分析

每个样品测得正反序列用 Bioedit 软件(Hall, 1999)进行拼接, 结合人工校正。MEGA4.0 软件(Tamura *et al*, 2007)构建 NJ(neighbor-joining)和 UPGMA(unweighted pair group method using arithmetic average)系统树, 采用 Bootstrap(重复数=1000)检验分析系统树拓扑结构和置信度。

## 2 结果

### 2.1 序列特性及碱基组成

经 PCR 扩增, 分别得到 5 个小孔蛸群体清晰的 16S rRNA 和 COI 基因片段扩增产物。序列测定表明, 5 个小孔蛸群体 16S rRNA 基因片段(30 个序列)长度范围为 497—501bp, 5 个小孔蛸群体 COI 基因片段(53 个序列)长度均为 652bp。

5 个小孔蛸群体的 16S rRNA 和 COI 序列片段的碱基组成(表 2)所示, 16S rRNA 序列中, 平均 T 37.2%、C 9.4%、A 34.9%、G 18.6%、A+T 72.1%; COI 序列中, 平均 T 36.0%、C 19.6%、A 29.9%、G 14.5%、A+T 65.9%、A+T 明显高于 G+C 含量。

在 16S rRNA 片段中, 5 个群体的种内个体间变异较小, 象山群体有 1 个转换, 7 个插入/缺失; 莆田群体有 1 个转换, 2 个插入/缺失; 温岭、宁德、厦门 3 个群体的所有序列完全相同。5 个群体序列间共检测到有 8 个变异位点(表 3)。5 个群体间的碱基变异主要是由 7 个碱基插入/缺失造成的, 其中最长的插入/缺失(4 个碱基)位于位点 234—247 处; 其它几个一个或

表 1 小孔蛸的采样地点及个数

Tab.1 Locations and numbers of *Cistopus* sp. collected in the coastal waters of China

编号	采样地点	经度(E)	纬度(N)	采样个数	取样部位
1—25	莆田(PT)	119.01 $^{\circ}$	24.26 $^{\circ}$	25	口球肌
26—50	温岭(WL)	121.36 $^{\circ}$	28.36 $^{\circ}$	25	口球肌
51—75	宁德(ND)	119.36 $^{\circ}$	26.39 $^{\circ}$	25	口球肌
76—100	厦门(XM)	118.06 $^{\circ}$	24.27 $^{\circ}$	25	口球肌
101—126	象山(XS)	121.80 $^{\circ}$	29.48 $^{\circ}$	26	口球肌

表 2 5 个群体小孔蛸 16S rRNA 和 CO I 基因片段的碱基组成(%)

Tab.2 The base composition (%) of 16S rRNA and CO I gene fragments of five stocks of *Cistopus* sp.

群体	16S rRNA 片段					CO 片段				
	T	C	A	G	A+T	T	C	A	G	A+T
XS	37.32	9.46	34.68	18.54	72.0	36.19	19.39	29.92	14.43	66.11
WL	37.1	9.4	34.9	18.6	72.0	35.88	19.62	29.9	14.6	65.78
ND	37.1	9.4	34.9	18.6	72.0	35.98	19.52	29.88	14.62	65.86
PT	37.13	9.4	34.9	18.57	72.03	35.91	19.6	29.94	14.55	65.85
XM	37.1	9.4	34.9	18.6	72.0	35.9	19.6	29.92	14.58	65.82
平均	37.2	9.4	34.9	18.6	72.1	36.0	19.6	29.9	14.5	65.9

两个碱基的插入/缺失散布于序列位点 280—320 之间的 3 个地方, 在 466bp 处有 1 个碱基转换(G → A)。

与 16S rRNA 片段相比, CO I 序列不存在任何插入/缺失位点, 群体内个体间变异位点数为 21 个。象山群体有 8 个转换, 1 个颠换; 温岭、厦门两个群体各有 1 个转换; 宁德群体有 2 个转换; 莆田群体有 10 个转换。群体间共检测到 14 个变异位点(表 4), 有 13 个转换, 1 个颠换。

## 2.2 系统树和单倍型

**2.2.1 系统树** 小孔蛸 5 个群体的 NJ(neighbor-joining)和 UPGMA 系统树通过 MEGA4.0 软件构建, 采用 Bootstrap(重复数=1000)检验分子系统树各分支的置信度。两种系统树的拓扑图总体趋势相似, 16S rRNA 的系统树较为简单(图 2), 30 个样品聚成两支: 一支为象山群体的 3 个样品和莆田群体 1 个样品聚类而成; 另一支为其它所有 26 个样品聚类而成(其中厦

表 3 16S rRNA 基因 4 种单倍型的变异位点和每种单倍型在各个群体中的个体数

Tab.3 Variable nucleotide positions in part of the 16S rRNA gene region of four haplotypes and the number of individual of each haplotype found in each stock

单倍型	变异位点(bp)								个体数(个)					
	234	235	236	237	281	290	320	466	XS	WL	ND	PT	XM	合计
H1	A	A	T	A	A	A	-	0	0	6	6	5	7	24
H2	.	.	.	.	.	.	T	A	0	0	0	1	0	1
H3	.	.	.	.	.	.	.	.	2	0	0	0	0	2
H4	-	-	-	-	.	-	T	A	3	0	0	0	0	3

注:“-”表示碱基缺失;“.”表示碱基相同

表 4 CO I 基因 8 种单倍型的变异位点和每种单倍型在各个群体中的个体数

Tab.4 Variable nucleotide positions in the CO I gene region of eight haplotypes and the number of individual for each haplotype found in every stock

单倍型	变异位点(bp)														个体数(个)					
	53	71	77	165	204	211	293	361	385	400	448	508	542	622	XS	WL	ND	PT	XM	合计
H1	T	A	T	T	G	A	G	G	T	C	C	C	G	C	5	9	0	8	9	31
H2	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0	1	0	0	0	1
H3	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0	0	2	0	0	2
H4	.	.	C	C	A	T	.	A	C	T	.	T	.	T	1	0	0	1	0	2
H5	.	.	.	C	.	T	.	A	.	T	.	T	.	T	7	0	0	0	0	7
H6	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	0	0	0	0	1	1
H7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	0	0	8	0	0	8
H8	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	0	0	0	1	0	1

注:“.”表示碱基相同

门、温岭、宁德三个群体个体全都聚为一支)。群体间的聚类可以看出: 厦门、温岭、宁德三个群体所有个体完全聚在一起, 莆田群体和象山群体与其它三个群体交叉, 从系统树可以看出 5 个群体都有交叉, 不能很明显的分离出某个群体。CO<sub>1</sub> 的系统树较 16S rRNA 的复杂(图 3)。从图 3 中可以看出, 宁德群体所有个体先聚为独立的两支(8 个个体聚为一支, 另两个聚为另一支), 温岭、莆田、厦门三个群体先聚类为一支, 再与宁德所有个体聚类, 并得到较高的 Bootstrap 支持(99%)。莆田群体的 09 号样与象山群体的 120 先聚类, 再与象山群体的大部分个体聚为一支, 然后再与另一大支聚在一起。

2.2.2 单倍型

16S rRNA : 共有 4 个单倍型, 单倍型 H1 为 4 个群体共有(象山群体除外), 且为最主要的单倍型, 出现的频率为 80%(24/30)。厦门、温岭、宁德三个群体仅共有单倍型 H1; 莆田、象山两个群体都有自己独特的单倍型, 象山群体具 2 个特有单倍型(单倍型 H3、H4); 莆田群体除拥有共有单倍型 H1 外, 还有自己特有的单倍型 H2。

CO<sub>1</sub> : 共有 8 种单倍型, 单倍型 H1 为 4 个群体共有(宁德群体除外), 且为最主要的单倍型, 出现的

频率是 56.6% (30/53)。每个群体都有自己独特的单倍型, 单倍型 H2、H3、H5、H6、H7、H8 都为群体独有单倍型(其中单倍型 H7 和 H3 都为宁德群体独有; H8-莆田群体; H2-温岭群体; H6-厦门群体; H5-象山群体), 单倍型 H4 为莆田、象山两个群体共有。在 5 个群体中, 象山群体和莆田群体拥有最多单倍型, 都为 3 种, 且有两种是共有(单倍型 H1、H4); 其它三个群体都有 2 种单倍型。其中宁德群体只拥有自己独特的两种单倍型, 没有单倍型 H1; 温岭群体和厦门群体除有共有单倍型 H1 外, 还有自己独特的一个单倍型。

3 讨论

本文得到的小孔蛸 16S rRNA 和 CO<sub>1</sub> 基因序列中 A+T 含量相差不大, 分别为 72.1%和 65.9%, 都明显高于 G+C 含量, 这一结果与其他研究者在头足类、双壳类等的 16S rRNA 和 CO<sub>1</sub> 基因中观察到的结果一致(Anderson, 2000; Zheng *et al.*, 2003; 孔晓瑜等, 2001), 即较高的 AT 含量, 是目前已检测的无脊椎动物线粒体 DNA 序列中较为普遍的现象(杨建敏等, 2003)。

一般认为, 在线粒体基因组中, 12S rRNA 和 16S rRNA 基因进化速率低, 比较保守, 而 CO<sub>1</sub> 基因为变异性较大的区域, 在软体动物(贝类)中检测到较大的

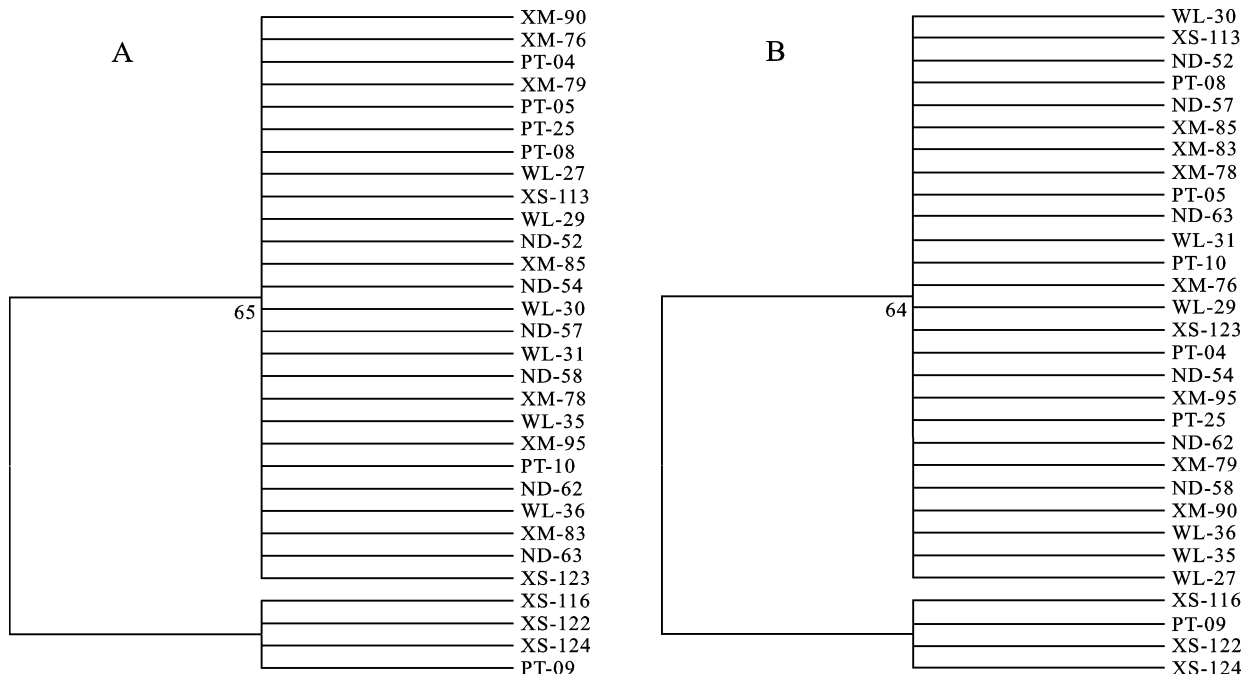


图 2 基于 16S rRNA 基因片段序列构建的小孔蛸 5 个群体的 NJ 和 UPGMA 系统发生树  
 Fig.2 NJ and UPGMA phylogenetic trees based on 16S rRNA gene sequences of the 5 stocks of *Cistopus* sp.  
 A: NJ; B: UPGMA. 群体后的数字表示样品编号(例如 ND-42 表示编号为 42 号的样品, 采集地点为宁德)

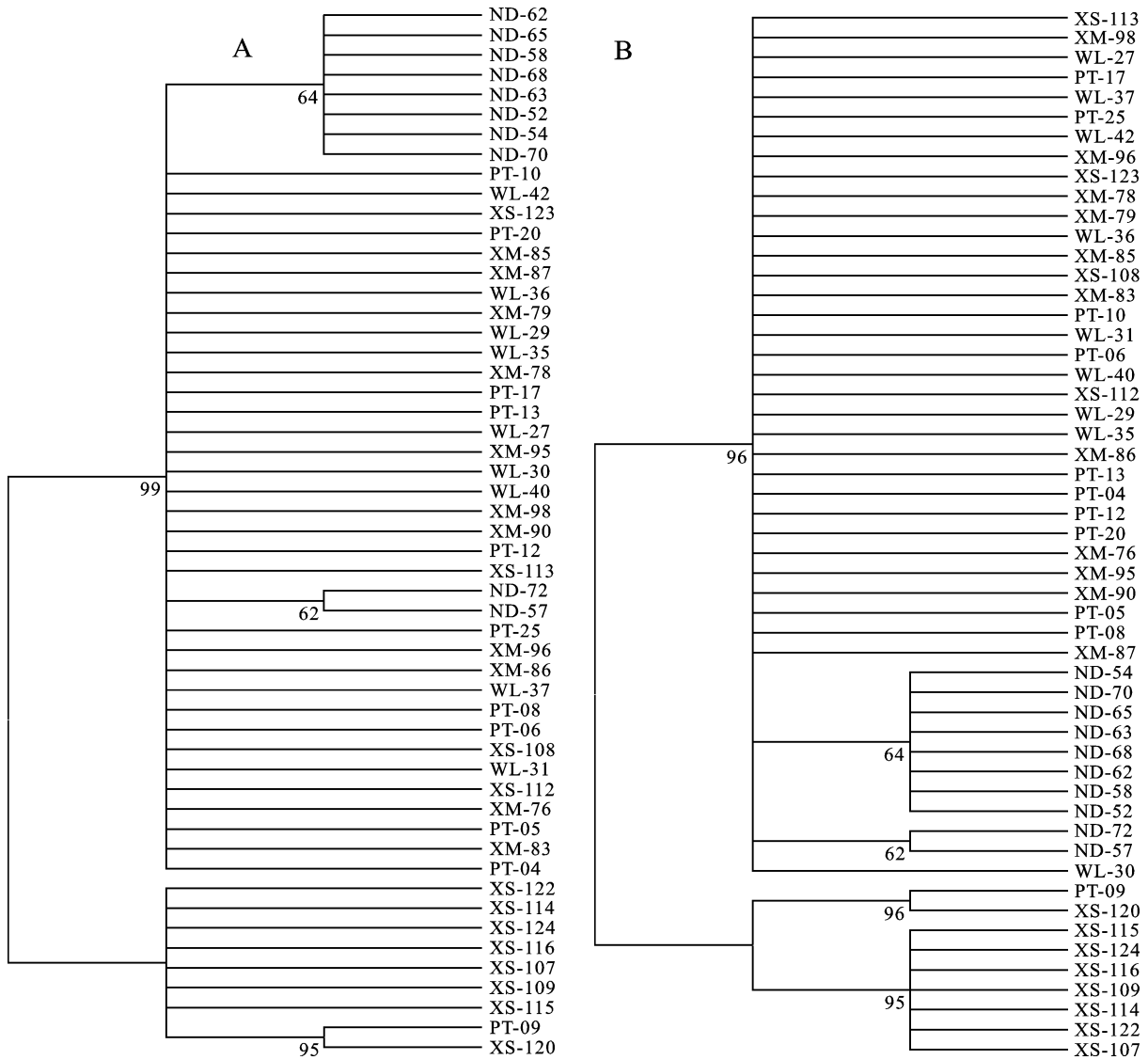


图 3 基于 CO 基因片段序列构建的小孔蛸 5 个群体的 NJ 和 UPGMA 系统发生树

Fig.3 NJ and UPGMA phylogenetic trees based on CO gene sequences of five stocks of *Cistopus* sp.

A: NJ; B: UPGMA. 群体后的数字表示样品编号(例如 ND-42 表示编号为 42 号的样品, 采集地点为宁德)

变异(苏天凤等, 2005; 陈丽梅等, 2005; 程汉良等, 2007)。从本实验的结果可以看出, 在长度为 497—501bp 的 16S rRNA 基因片段中, 小孔蛸 5 个群体存在 8 个碱基变异, 仅有 4 种单倍型; 而在长度为 652bp 的 CO 基因片段中, 存在 14 个碱基变异, 具有 8 种单倍型, 且每个群体的单倍型多样性多于 16S rRNA。本文中得到了 5 个群体小孔蛸的 16S rRNA 和 CO 基因序列中, CO 基因表现出的群体内和群体间趋异都要高于 16S rRNA 基因, 说明在小孔蛸的 5 个群体中, CO 基因的进化速率与 16SrRNA 基因相比要快, 16S rRNA 基因则相对保守一些。小孔蛸线粒体 16S rRNA 和 CO 基因在不同群体间其多态性并

无明显差异, 不能很明显的将不同地理群体分开。Zheng 等(2003)采用线粒体 16S rRNA 序列分析了我国沿海日本无针乌贼(又称曼氏无针乌贼)的群体结构; Oosthuizen 等(2004)采用 mtDNA CO II 序列分析了南非沿海的真蛸群体; Aoki 等(2008)采用线粒体非编码区序列(Non-coding Region)研究了日本海域莱氏拟乌贼群体遗传结构, 均发现了较低的遗传多样性。头足类作为游泳型贝类, 其线粒体 DNA 序列可能并不适合做种以下阶元的遗传多样性分析, 更适合当做条形码 DNA 用于属、科以上阶元的系统发生学研究 (Strugnell *et al*, 2008)。

自 Shaw(1997)首次采用高度多态微卫星位点对

东北大西洋的福氏枪乌贼群体进行了报道以来, 微卫星 DNA(msDNA)技术为研究头足类群体结构和遗传多样性提供了一个新途径的应用, 尤其在采用其它方法(如同工酶电泳、线粒体 DNA 序列等)检测的低变异的种类[如真蛸(Murphy *et al*, 2002)、金乌贼(Zheng *et al*, 2009)]。有关小孔蛸种群的 msDNA 研究正在进行中。

由 16S rRNA 和 CO 基因片段得到的系统树所表现的趋势相似。基于两段基因片段的系统树(NJ 和 UPGMA)聚类结果可看出宁德和象山两个群体通过 CO 可以区别于其它三个群体。16S rRNA 和 CO 分析结果显示厦门、温岭、莆田 3 个群体几乎都完全交叉, 表明这三个群体由于地理位置邻近可能存在一定的基因交流, 而宁德为一个封闭的港湾, 与外海的基因交流受到限制, 而象山距离其它四个采样点较远。对于莆田群体的 09 号个体与象山群体的亲缘关系很近的原因还有待进一步的研究。

#### 参 考 文 献

- 孔晓瑜, 刘亚军, 喻子牛等, 2001. 栉孔扇贝和海湾扇贝线粒体 DNA 16S rRNA 基因片段序列研究. 见: 中国贝类学会主编. 贝类学论文集第 IX 辑. 北京: 海洋出版社, 9: 59—63
- 苏天凤, 江世贵, 周发林等, 2005. 近江牡蛎 16S rRNA 基因片段序列变异分析. 高技术通讯, 15(2): 100—103
- 杨建敏, 郑小东, 王如才等, 2003. 3 种鲍 16S rRNA 基因片段序列的初步研究. 青岛海洋大学学报, 33(1): 36—40
- 陈丽梅, 孔晓瑜, 喻子牛等, 2005. 3 种蛸类线粒体 16S rRNA 和 CO 基因片段的序列比较及其系统学初步研究. 海洋科学, 29(8): 27—32
- 林祥志, 郑小东, 苏永全等, 2006. 蛸类养殖生物学研究现状及展望. 厦门大学学报(自然科学版), 45(2): 213—218
- 郑玉水, 李复雪, 1987. 东海头足类的研究. 福建水产, 3: 15—21
- 董正之, 1987. 中国动物志——软体动物门: 头足纲. 北京: 科学出版社, 1—20
- 程汉良, 夏德全, 吴婷婷等, 2007. 6 种帘蛤科贝类及 4 个地理种群文蛤线粒体 CO 基因片段序列分析. 海洋学报, 29(5): 109—116
- Anderson F E, 2000. Phylogeny and historical biogeography of the loliginid squids (Mollusca: Cephalopoda) based on mitochondrial DNA sequence data. Molecular Biology and Evolution, 15(2): 191—214
- Aoki M, Imai H, Naruse T *et al*, 2008. Low Genetic Diversity of Oval Squid, *Sepioteuthis cf. lessoniana* (Cephalopoda: Loliginidae), in Japanese Waters Inferred from a Mitochondrial DNA Non-coding Region. Pacific Science, 62: 403—411
- Hall T A, 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series, 41: 95—98
- Murphy J M, Balguer í as E, Key L N *et al*, 2002. Microsatellite DNA markers discriminate between two *Octopus vulgaris* (Cephalopoda: Octopoda) fisheries along the northwest African coast. Bulletin of Marine Science, 71: 545—553
- Oosthuizen A, Jiwaji M, Shaw P, 2004. Genetic analysis of the *Octopus vulgaris* population on the coast of South Africa. South African Journal of Science, 100: 603—607
- Sambrook J, Fitch E, Maniatis T, 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd eds. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 463—468
- Shaw P W, 1997. Polymorphic microsatellite DNA markers in the veined squid *Loligo forbesi*. Molecular Ecology, 6: 297—298
- Strugnell J M, Collins M A, Allcock A L, 2008. Molecular evolutionary relationships of the octopodid genus *Thaumeledone* (Cephalopoda: Octopodidae) from the Southern Ocean. Antarctic Science, 20: 245—251
- Tamura K, Dudley J, Nei M *et al*, 2007. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software Version 4.0. Molecular Biology and Evolution, 24(8): 1596—1599
- Zheng X D, Ikeda M, Kong L F *et al*, 2009. Genetic diversity and population structure of the golden cuttlefish, *Sepia esculenta* indicated by microsatellite DNA variations. Marine Ecology, doi:10.1111/j.1439-0485.2009.00294.x
- Zheng X D, Wang R C, Xiao S *et al*, 2003. Genetic diversity in populations of *Sepiella maindroni* using 16S rRNA gene sequence analysis. High Technology Letters, 9(1): 1—5

## GENETIC DIVERSITY IN POPULATIONS OF *CISTOPUS* SP. BASED ON THE SEQUENCES OF MITOCHONDRIAL 16S rRNA AND CO<sub>II</sub> GENE FRAGMENTS

YANG Qiu-Ling<sup>1,2</sup>, LIN Xiang-Zhi<sup>1</sup>, ZHENG Xiao-Dong<sup>3</sup>, SU Yong-Quan<sup>2</sup>

(1. Third Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Xiamen, 361005; 2. College of Oceanography and Environmental Science, Xiamen University, Xiamen, 361005; 3. Fisheries College, Ocean University of China, Qingdao, 266003)

**Abstract** Sequences of 16S rRNA and CO<sub>II</sub> gene fragments in mtDNA of *Cistopus* sp. were studied. The samples were collected from five populations in the East China Sea. The sequences were compared by PCR. Nucleotide sequences of 497—501bp for 16S rRNA gene and 652bp for CO<sub>II</sub> gene were obtained. A high percentage of A+T base composition in the two sequences was observed. The alignment indicated that the variation level of intra-stocks was very low in both genes. Eight variable sites were detected for 16S rRNA gene fragment (of which seven were indels) across the five stocks. 21 polymorphic sites were detected in CO<sub>II</sub> gene fragments among the five stocks, with no indels. The NJ and UPGMA phylogenetic trees showed that no remarkable genetic difference was observed among those populations.

**Key words** *Cistopus* sp., Mitochondrial DNA, 16S rRNA gene, CO<sub>II</sub> gene