

# 中国沿海长蛸(*Octopus variabilis*)自然群体线粒体 COI 基因遗传多样性研究\*

孙宝超<sup>1,2</sup> 杨建敏<sup>1,2</sup> 孙国华<sup>1</sup> 刘相全<sup>1</sup> 刘丽娟<sup>1</sup>  
王卫军<sup>1</sup> 郑小东<sup>3</sup>

(1. 山东省海洋水产研究所 烟台 264006; 2. 上海海洋大学 上海 201306;  
3. 中国海洋大学 青岛 266003)

**摘要** 对我国沿海 5 个自然群体长蛸的线粒体细胞色素氧化酶亚基 I(COI)部分序列进行了测定和分析, 经比对获得 658bp 核苷酸片段, 其中碱基 T、C、A 和 G 的平均含量分别为 37.02%、18.46%、30.15%和 14.35%, AT 的含量明显高于 GC 的含量。5 个自然群体的长蛸中共发现 18 个变异位点, 得到 15 个单倍型, 包括 4 个共享单倍型, 其中青岛群体的核苷酸差异数  $K$  以及平均核苷酸多样性指数  $P_i$  最高, 烟台群体最低; 群体间, 青岛群体在群体间核苷酸差异数  $K$ 、群体间平均每位点核苷酸替代数  $D_{xy}$  和群体间每位点净核苷酸替代数  $D_a$  三个指标上都表现出比其它群体之间较高的水平, 说明青岛群体具有最为丰富的遗传多样性。MEGA 3.1 软件计算 5 个群体间的 Kimura 2-parameter 遗传距离, 大连群体和青岛群体之间的遗传距离最远为 0.0077, 而大连群体与烟台群体之间的遗传距离最低, 为 0.0029。AMOVA 分析表明, 五群体间总遗传分化系数  $F_{st} = 0.17410$  ( $P < 0.05$ ), 群体间遗传分化远小于群体内。NJ 法和 UPGMA 法构建的分子进化树, 5 个地理群体的长蛸聚为两个族群, 大连、烟台群体聚为一族群, 青岛、连云港和舟山群体聚为另一族群。

**关键词** 长蛸, COI 基因, PCR, 遗传多样性

**中图分类号** Q953

长蛸(*Octopus variabilis* Sasaki), 别名长腿蛸、大蛸(山东)、石拒(浙江)、长爪章(广东), 隶属头足纲(Cephalopoda)、八腕目(Octopoda)、蛸科(Octopodidae)、蛸属(*Octopus*), 分布于我国南北近海, 以北部近海数量较多。长蛸为沿岸底栖种类, 是肉食性动物, 大量捕食蟹类, 其肉味鲜美, 是一种重要的经济头足类。由于渔业资源逐渐衰退, 目前, 我国沿海已逐渐开展了长蛸的人工养殖。为了有效利用和保护蛸科的种质资源, 开展有关蛸科动物的遗传结构和遗传变异水平的研究是非常必要的。

目前, 有关长蛸的研究主要集中在生物学、人工育苗与养殖、渔业和生理生化及组织学的研究上(孙

同秋等, 2008; Wells *et al.*, 1995), 分子遗传学方面的研究较少。关于长蛸的遗传变异在细胞学及分子水平已有研究(Inaba, 1959; Lin *et al.*, 2004), 而采用分子标记方法对长蛸群体遗传特性的研究尚无报道。本研究对分布于中国沿海 5 个自然群体的长蛸的 mtDNA COI 基因序列片段进行了扩增和测序和群体遗传特性的研究, 为进一步开展长蛸群体分子遗传多样性分析、遗传育种及种质资源的研究和保护提供基础资料。细胞色素氧化酶 I 亚基 (cytochrome oxidase subunit I, COI) 基因具有进化速率适中的特点, 可作为种属系统进化研究的良好标记(Martínez-Navarro *et al.*, 2005; 付景等, 2006), 在群体遗传多样性的研究上

\* 山东省优秀中青年科学家奖励基金(博士基金), 2006BS06010 号; 国家“863”计划“中国近海贝类资源的采集、保存与信息化技术”, 2007AA09Z433 号。孙宝超, 硕士, E-mail: baochaosun@163.com

通讯作者: 杨建敏, 博士, 研究员, E-mail: ladderup@126.com

收稿日期: 2009-05-15, 收修改稿日期: 2009-07-12

也有广泛的应用(杨学明等, 2006; 林琪等, 2008a, b)。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

于 2007 年 12 月—2008 年 3 月, 采集了大连、烟台、青岛、连云港、舟山五个自然群体的长蛸(*Octopus variabilis*)个体(表 1), 样品进行传统分类方法鉴定和生物学测量后, 取腕部和胴体部的肌肉组织, 置于  $-70^{\circ}\text{C}$  保存备用。

表 1 中国沿海长蛸群体、时间以及样品数量和平均体重(g)  
Tab.1 The population quantity, date, and average weight (g) of *O. variabilis* in Chinese coastal waters

| 群体  | 代码 | 数量(个) | 时间(年.月.日)  | 平均体重 $\pm$ 标准差     |
|-----|----|-------|------------|--------------------|
| 大连  | DL | 8     | 2008.01.22 | 254.65 $\pm$ 48.83 |
| 烟台  | YT | 8     | 2008.01.23 | 263.11 $\pm$ 36.41 |
| 青岛  | QD | 6     | 2008.03.26 | 257.42 $\pm$ 58.74 |
| 连云港 | LY | 8     | 2007.12.23 | 195.76 $\pm$ 65.43 |
| 舟山  | ZS | 8     | 2008.01.06 | 136.24 $\pm$ 38.07 |

### 1.2 实验方法

**1.2.1 基因组总 DNA 的提取** 取 100mg 长蛸胴体部肌肉, 放入 1.5ml eppendorf 管中剪碎, 加入 700 $\mu\text{l}$  2 $\times$ CTAB 缓冲溶液[100mmol/L Tris-HCl, 200mmol/L EDTA, 1.4mmol/L NaCl, 2%十六烷基三甲基溴化铵(CTAB), 0.2%  $\beta$ -巯基乙醇, pH 8.0]和 10 $\mu\text{l}$  (20mg/ml) 蛋白酶 K, 55 $^{\circ}\text{C}$  水浴过夜。用 600 $\mu\text{l}$  的混合液( $V_{\text{酚}}$  :  $V_{\text{氯仿}}$  :  $V_{\text{异戊醇}} = 25 : 24 : 1$ )抽提 2 次, 混合液( $V_{\text{酚}}$  :  $V_{\text{异戊醇}} = 24 : 1$ )抽提 1 次。加入  $-20^{\circ}\text{C}$  预冷的无水乙醇,  $-20^{\circ}\text{C}$  沉淀 2h。离心后用 70%乙醇洗两次, 加入 100 $\mu\text{l}$  双蒸水溶解,  $-20^{\circ}\text{C}$  保存备用。用 0.8%琼脂糖电泳检测 DNA 完整度, 用紫外分光光度计测 DNA 含量。

**1.2.2 PCR 扩增** COI 基因片段扩增所用引物的核苷酸序列为: COI F 5'-GGTCAACAAATCATAAAG ATAT TGG-3' (25bp), COI R 5'-TAA ACTTCAGGG TGACCAAAAAT CA-3' (26bp); PCR 扩增在 ABI 9600 型 PCR 仪上进行。50 $\mu\text{l}$  反应体积内含: 25mmol/L  $\text{MgCl}_2$  4 $\mu\text{l}$ , 10mmol/L 每种 dNTP 1.25 $\mu\text{l}$ , 10mmol/L 每个引物 1.5 $\mu\text{l}$ , 40ng DNA 模板, 1.5U *Taq* 酶及 10 $\times$ 缓冲液(购自上海生工)5 $\mu\text{l}$ 。PCR 反应程序: 94 $^{\circ}\text{C}$  2min, 然后 94 $^{\circ}\text{C}$  30s, 51 $^{\circ}\text{C}$  1min, 72 $^{\circ}\text{C}$  1min, 共 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$  5min 延伸。PCR 产物在 1%的琼脂糖凝胶中电泳, EB 染色, 凝胶成像系统观察、照相。

**1.2.3 PCR 产物纯化** 用上海生工 UNIQ-10 PCR 产物纯化试剂盒纯化。

**1.2.4 测序** 纯化后的 PCR 产物由上海生工进行双向测序, 所用测序仪器为 ABI PRISM 3730, 测序试剂为 BigDye terminator v3.1, 应用 DNASTAR 软件(DNASTAR, Icn)的 SeqMan 进行 DNA 序列编辑比对, 并根据峰值图进行人工核对、矫正。

**1.2.5 统计分析** 用 MEGA 3.1 (Kumar *et al*, 2004) 进行同源排序比对, 确定序列长度; 计算不同序列间的碱基组成、变异位点、简约信息位点和不同地理种群的 Kimura 2-paramter 遗传距离。采用 Kimura 2-paramter 距离矩阵采用邻接法(NJ)以及非加权配对算数平均法(UPGMA)构建单倍型分子系统树, 系统树中节点的自举置信水平应用自引导(bootstrap)估计, 共 1000 次循环。

用 DNASP 4.50 (Rozas *et al*, 2003)软件计算各个群体的单倍型, 单倍型多态性, 多态位点数, 平均核苷酸差异数, 核苷酸多样性指数, 基因流  $N_m$  等。

用 ARLEQUIN 3.11 (Excoffier *et al*, 2005)中的分子变异分析(AMOVA)分析方法估算遗传变异在群体内和群体间的分布及遗传分化系数( $F$ -statistics,  $F_{st}$ ), 并计算并用排列测验法(permutation test)检验  $F_{st}$  的显著性(重复次数为 1000)。

## 2 结果

### 2.1 目的片段的扩增、纯化、序列测定及碱基特性

目的 DNA 基因片段经 PCR 扩增后得到清晰整齐的电泳谱带。PCR 产物经纯化试剂盒纯化, 得到了纯度较高的 COI 基因片段。经序列测定获得长度为 709bp 左右核苷酸序列(含引物序列)。

序列经 Clustal 对位排序后, 去掉引物序列, 得到 658bp 同源片段序列。长蛸线粒体 COI 基因的碱基 T、C、A、G 和 A+T 含量分别为 37.02%、18.46%、30.15%、14.3%和 67.17% (表 2); 通过比较看出, 5 个群体碱基组成接近, 但碱基均出现了偏倚, T 的含量都明显高于 C, 而且(A+T)的平均含量为 67.17%, 远高于(G+C)的含量, 这符合线粒体 DNA 的碱基组成特点, 虾蟹类等无脊椎动物的 COI 基因片段研究结果也显示出类似的特性(Harrison, 2004)。

### 2.2 COI 基因片段的多态性分析

同源片段序列对位排序和分析后, 在所测碱基序列中共发现 18 个变异位点, 这些变异位点包括 14 个转换(transition)位点(其中 T/C 10 处, A/G 4 处)和 10 个颠换(transversion)位点(其中 A/T 3 处, G/T 1 处), 转换与颠换的比值为 1.4 : 1。其中简约信息位点 9 个,

没有发现插入/缺失突变的核苷酸位点, 5 个群体均未检测到群体所独有的可作为遗传标记的特征突变位点。

从 18 个 COI 序列碱基变异位点中共定义了 15 个单倍型。图 1 为单倍型 1 的碱基序列。15 种单倍型中, 基因序列表达为单倍型 1 的个体总数最多, 占分析个体总数的 31.6%。5 个群体的所有单倍型中, 共

享单倍型有 4 种, 占单倍型总数的 26.67%, 其余均为单一群体所特有。单倍型及其在 5 个群体长蛸群体中的分布如表 3 所示。共享单倍型 Hap 1 为 4 个群体(大连、烟台、连云港、舟山)共享, 单倍型 Hap 6 为 2 个群体(青岛、连云港)共享, 单倍型 Hap 9 为 2 个群体(青岛和舟山)共享, 单倍型 Hap 11 为 3 个群体(大连、青岛和舟山)共享。

表 2 5 个地理群体长蛸 mtDNA COI 序列的碱基组成(%)  
Tab 2 Base compositions (%) of COI sequences of *O. variabilis* from the five populations

| 碱基  | 大连(DL) | 烟台(YT) | 青岛(QD) | 连云港(LY) | 舟山(ZS) | 平均    |
|-----|--------|--------|--------|---------|--------|-------|
| T   | 36.99  | 37.04  | 37.05  | 37.04   | 36.99  | 37.02 |
| C   | 18.52  | 18.49  | 18.41  | 18.42   | 18.48  | 18.46 |
| A   | 30.15  | 30.19  | 30.09  | 30.20   | 30.11  | 30.15 |
| G   | 14.34  | 14.26  | 14.43  | 14.32   | 14.42  | 14.35 |
| A+T | 67.14  | 67.24  | 67.15  | 67.24   | 67.10  | 67.17 |

```

001 AACACTATAT TTTATTTTTG GAATCTGATC AGGTCTTCTA GGAACTTCTT TAAGATTAAT AATTCGTACT
071 GAATTAGGTC AACCAGGTTC ACTACTCAAC GATGATCAAC TTTATAATGT TATTGTAAC TGCACATGCAT
141 TTGTAATAAT TTTTTTTTGA GTAATACCTG TTATAATCGG AGGATTGGGA AATTGATTAG TTCCTTTAAT
211 ATTAGGTGCA CCAGATATAG CATTCCCGCG AATAAATAAT ATAAGATTTT GACTTCTTCC TCCTTCCCTA
281 ACCTTATTAT TAACCTCTGC AGCTGTGAA AGAGGAGTAG GAACAGGATG AACCGTATAT CCTCCTTTAT
351 CAAGAAATCT CGCTCATACA GGACCATCTG TAGACCTAGC AATTTTCTCA CTCCATTAG CAGGAATTC
421 ATCTATTTTA GGAGCTATTA ACTTCATAAC TACTATTATC AATATACGAT GAGAAGGAAT ACAAAATAGAA
491 CGTCTTCTT TGTTTGTTTG ATCAGTATTT ATTACAGCTA TCCTTCTTCT TTTATCATT CCTGTTCTTG
561 CTGGAGCTAT TACTATATTA TTAACGTATC GAAATTTTAA TACTACTTTC TTTGACCCAA GAGGAGGAGG
631 AGATCCAATC TTATACCAAC ATTTATTC
    
```

图 1 长蛸线粒体 COI 基因片段核苷酸序列

Fig.1 The nucleotide sequences of COI gene fragments of *O. variabilis*

表 3 长蛸 5 个群体线粒体 COI 基因单倍型片段序列及变异位点

Tab.3 Variable nucleotide positions in part of the COI region of 15 haplotypes, and number of individuals of each haplotype found in each locality

| 单倍型 | 11223355666<br>12226707081303155<br>550250608576428013 | 变异位点数量 |    |    |    |    |
|-----|--|--------|----|----|----|----|
|     |  | DL     | YT | QD | LY | ZS |
| 1   | CTGACTACCTTACGTCAT                                     | 3      | 7  | 0  | 1  | 1  |
| 2   | .....T..C.T.C...                                       | 0      | 0  | 0  | 3  | 0  |
| 3   | ...G.....  | 2      | 0  | 0  | 0  | 0  |
| 4   | .....T.C.GTACT..                                       | 1      | 0  | 0  | 0  | 0  |
| 5   | .....T..CGT.C...                                       | 0      | 0  | 0  | 0  | 4  |
| 6   | .....T...GT.CT..                                       | 0      | 0  | 1  | 3  | 0  |
| 7   | ..TG.....  | 0      | 0  | 1  | 0  | 0  |
| 8   | .....A.T..CGT.C...                                     | 0      | 0  | 1  | 0  | 0  |
| 9   | .A.G...T...GT.CT..                                     | 0      | 0  | 1  | 0  | 1  |
| 10  | .....T...GT.C...                                       | 0      | 0  | 1  | 0  | 0  |
| 11  | .....G.....T.  | 1      | 0  | 1  | 0  | 1  |
| 12  | .....A....   | 0      | 0  | 0  | 1  | 0  |
| 13  | ....T.....TC   | 1      | 0  | 0  | 0  | 0  |
| 14  | T.....   | 0      | 1  | 0  | 0  | 0  |
| 15  | .....T.....  | 0      | 0  | 0  | 0  | 1  |

### 2.3 长蛸各群体内遗传多样性分析

对 5 个自然群体长蛸的遗传多样性参数进行分析, 如表 4 所示。结果表明, 在单倍型参数中, 青岛群体的单倍型数  $N_{\text{hap}}$  及单倍型多样性  $H_d$  最高, 分别为 6 和(1.000±0.096), 最低的为烟台群体, 分别为 2 和(0.250±0.180); 在核苷酸参数中, 平均核苷酸差异数  $K$  以及平均核苷酸多样性指数  $P_i$  显示, 青岛群体最高, 分别为 5.200 和 0.00799, 其次为舟山群体, 最低的为烟台群体。青岛群体和大连群体的单倍型多样性都大于 0.8, 其单倍型多态性较为丰富。综合两项参数, 五群体中青岛群体遗传多样性最高, 烟台群体遗传多样性最低。

### 2.4 长蛸各群体间遗传多样性分析

对长蛸各个自然群体之间的相关遗传参数进行

分析, 结果如表 5 所示, 群体间平均核苷酸差异数  $K$  值在 1.842—4.549 之间, 峰值和最低值出现在与青岛和烟台相关的两个群体中, 表明青岛群体在核苷酸序列多样性方面与其它群体有着最大的趋异情形, 而烟台群体则相对稳定。

群体间平均每位点核苷酸替代数( $D_{xy}$ )与群体间每位点净核苷酸替代数( $D_a$ )显示(表 6), 这两个遗传参数的峰值和最低值均是分别出现在与青岛和烟台两个相关群体当中。数据显示, 青岛群体是 5 个地理群体中遗传背景最为丰富, 具有最为丰富的遗传多样性的居群。

### 2.5 长蛸群体遗传变异和遗传结构

5 个地理群体长蛸的 mtDNA COI 序列的遗传差异 AMOVA 分析如表 7 所示, 结果表明, 群体间遗传

表 4 长蛸 5 个自然群体的遗传多样性参数比较  
Tab.4 Summary of genetic diversity of different *O. variabilis* populations

| 遗传多样性参数               | 大连(DL)      | 烟台(YT)      | 青岛(QD)      | 连云港(LY)     | 舟山(ZS)      | 总结          |
|-----------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 单倍型数 $N_{\text{hap}}$ | 5           | 2           | 6           | 4           | 5           | 15          |
| 单倍型多样性 $H_d$          | 0.857±0.108 | 0.250±0.180 | 1.000±0.096 | 0.786±0.113 | 0.786±0.151 | 0.878±0.040 |
| 多态位点 $S$              | 12          | 1           | 12          | 7           | 11          | 18          |
| 平均核苷酸差异数 $K$          | 3.357       | 0.250       | 5.200       | 3.143       | 4.214       | 3.765       |
| 核苷酸多样性指数 $P_i$        | 0.00514     | 0.00038     | 0.00799     | 0.00481     | 0.00640     | 0.00572     |

表 5 长蛸群体间平均核苷酸差异数  $K$  及遗传距离  $D$

Tab.5 Average number of nucleotide differences between populations ( $K$ ) and the pairwise distances matrix for the COI gene fragment ( $D$ )

| 群体 | DL    | YT     | QD     | LY     | ZS     |
|----|-------|--------|--------|--------|--------|
| DL | —     | 0.0029 | 0.0077 | 0.0068 | 0.0072 |
| YT | 1.842 | —      | 0.0068 | 0.0055 | 0.0059 |
| QD | 4.549 | 3.286  | —      | 0.0061 | 0.0066 |
| LY | 3.900 | 2.725  | 3.912  | —      | 0.0054 |
| ZS | 4.267 | 3.108  | 4.418  | 3.583  | —      |

注: 对角线左下方为  $K$ , 右上方为  $D$

表 6 长蛸群体间平均每位点核苷酸替代数  $D_{xy}$  及净核苷酸替代数  $D_a$   
Tab.6 Average number of nuc. subs. and net nuc. subs. per site ( $D_{xy}$ ,  $D_a$ ) between populations

| 群体 | DL      | YT      | QD      | LY        | ZS        |
|----|---------|---------|---------|-----------|-----------|
| DL | —       | 0.00011 | 0.00116 | 0.00185   | 0.00137   |
| YT | 0.00285 | —       | 0.00263 | 0.00293   | 0.00250   |
| QD | 0.00766 | 0.00678 | —       | - 0.00032 | - 0.00063 |
| LY | 0.00679 | 0.00551 | 0.00602 | —         | - 0.00027 |
| ZS | 0.00712 | 0.00589 | 0.00652 | 0.00532   | —         |

注: 对角线左下方为  $D_{xy}$ , 右上方为  $D_a$

分化系数  $F_{st} = 0.17410$  ( $P < 0.05$ ), 说明在整个遗传变异中群体间占 17.41%, 而来自于群体内的遗传变异占 82.59%。可见, 群体内遗传变异远大于群体间遗传变异, 群体内变异是遗传变异的主要来源。基因流 ( $N_m$ ) 和遗传分化系数 ( $F_{st}$ ) 分析结果如表 8 所示, 烟台群体与大连、青岛群体之间, 舟山群体与大连、青岛群体之间都有着较大的遗传分化系数。大连群体和烟台群体间以及连云港群体和舟山群体间基因流  $N_m$  值都较大, 分别为 4.14 和 3.50, 说明群体间有较频繁的基因交流, 从而降低了群体间的遗传分化。

表 7 5 个地理群体长蛸群体间遗传差异的分子方差分析表 (AMOVA)

Tab.7 Analysis of molecular variance (AMOVA) among populations of *O. variabilis*

| 变异来源 | 自由度 $D_f$ | 平方和    | 方差组分                  | 方差比例(%) |
|------|-----------|--------|-----------------------|---------|
| 群体间  | 4         | 13.461 | 0.27308 <sup>Va</sup> | 17.41   |
| 群体内  | 33        | 42.750 | 1.29545 <sup>Vb</sup> | 82.59   |
| 总变异  | 37        | 56.211 | 1.56854               |         |

注: 遗传分化系数 ( $F_{st}$ ) = 0.17410 ( $P < 0.05$ ,  $P = 0.00684$ )。上标 <sup>Va</sup> 和 <sup>Vb</sup> 表示差异显著程度

表 8 长蛸 5 个地理群体间的基因流 ( $N_m$ ) 和遗传分化系数 ( $F_{st}$ )

Tab.8 Gene flow ( $N_m$ ) and genetic fixations index ( $F_{st}$ ) between and within five populations of *O. variabilis*

| 群体 | DL   | YT      | QD      | LY       | ZS       |
|----|------|---------|---------|----------|----------|
| DL | —    | 0.03810 | 0.15136 | 0.27273  | 0.19238  |
| YT | 4.14 | —       | 0.38879 | 0.53202  | 0.42396  |
| QD | 1.36 | 2.00    | —       | -0.05383 | -0.09681 |
| LY | 0.50 | 0.44    | 2.00    | —        | -0.05102 |
| ZS | 0.64 | 0.58    | 2.36    | 3.50     | —        |

注: 对角线下为基因流  $N_m$ , 对角线上为  $F_{st}$

## 2.6 长蛸群体遗传分化和聚类分析

利用 MEGA 3.1 软件中的 Kimura 2-paramter 双参数模型 (转换+颠换) 计算长蛸 5 群体间的遗传距离, 结果表明, 长蛸 5 个群体间的遗传距离在 0.0029—0.0077 之间, 尤其青岛群体与其它群体的遗传距离值均较高。采用 NJ 法和 UPGMA 法构建了 5 个群体长蛸的系统树, 并对各分支均进行 1000 次的重复检验, 两种系统树结果相同, 聚类结果见图 2。5 个群体的所有个体被分为 A、B 两个族群, A 族群包括大连、烟台群体, B 族群包括青岛、连云港、舟山群体。但

不同群体的个别个体在两个分支的族群中有交叉, 可能与分支的两个族群间有一定的基因交流有关。

## 3 讨论

细胞色素氧化酶基因进化速度比较快, 是检测群体遗传变异和分析不同群体遗传特性中, 应用较广的一种分子标记, 在鱼类 (张凤英等, 2008)、虾蟹类等 (杨学明等, 2006; 林琪等, 2008; 程汉良等, 2007) 水产动物中都有广泛应用。有关头足类分子水平的研究, Lin 等 (2004) 采用 16S rRNA 和 COI 基因序列对 13 种头足类的遗传变异和系统发生进行了研究。国内外对于长蛸遗传变异的研究已陆续开展, 有关 COI 基因在长蛸群体遗传多样性方面的研究尚无报道。

本研究测定了 5 个地理群体长蛸线粒体 DNA COI 基因序列, 得到 658bp 的基因序列片段, 碱基组成上出现了偏倚。A+T 平均含量为 67.2%, 远高于 G+C 的含量, A T 含量高这种现象不仅在鱼类、虾蟹类以及贝类等水产动物中具有, 许多无脊椎动物也普遍表现有该特性。

5 个不同地理群体的长蛸, 所得到的 658bp 线粒体 COI 基因序列片段中, 仅出现 18 个变异位点, 变异位点仅占所有位点比例的 2.74%, 并且未发现插入/缺失突变的核苷酸位点。变异位点的来源可能与长蛸生活的自然生态环境和地理环境等因素有关, 5 个地理群体的所有变异位点中均未检测到可以作为区分居群的分子遗传标记的特征突变位点; 因而, 长蛸不同群体的特征分子标记位点和不同群体遗传特征的确定, 还需结合其它分子标记技术进行进一步审定。

青岛群体的单倍型数  $N_{Hap}$  及单倍型多样性  $H_d$  最高, 分别为 6 和 (1.000 ± 0.096), 而烟台群体的这两个参数都最低。平均核苷酸差异数  $K$  和群体间遗传多样性参数  $D_{xy}$ 、 $D_a$  三个指标上, 青岛群体都表现出较高的水平。说明青岛群体具有最为丰富的遗传多样性和丰富的遗传背景。大连群体和烟台群体之间, 连云港群体和舟山群体间基因流较大, 造成群体间遗传分化变小, 由 NJ 和 UPGMA 的对 5 个群体长蛸的聚类分析也验证了这点, 大连群体和烟台群体聚为一个族群, 青岛群体、舟山群体和连云港群体聚为另一族群, 但是群体单倍型的个别个体在两个族群间有交叉, 这可能与群体间的遗传渗透有关。

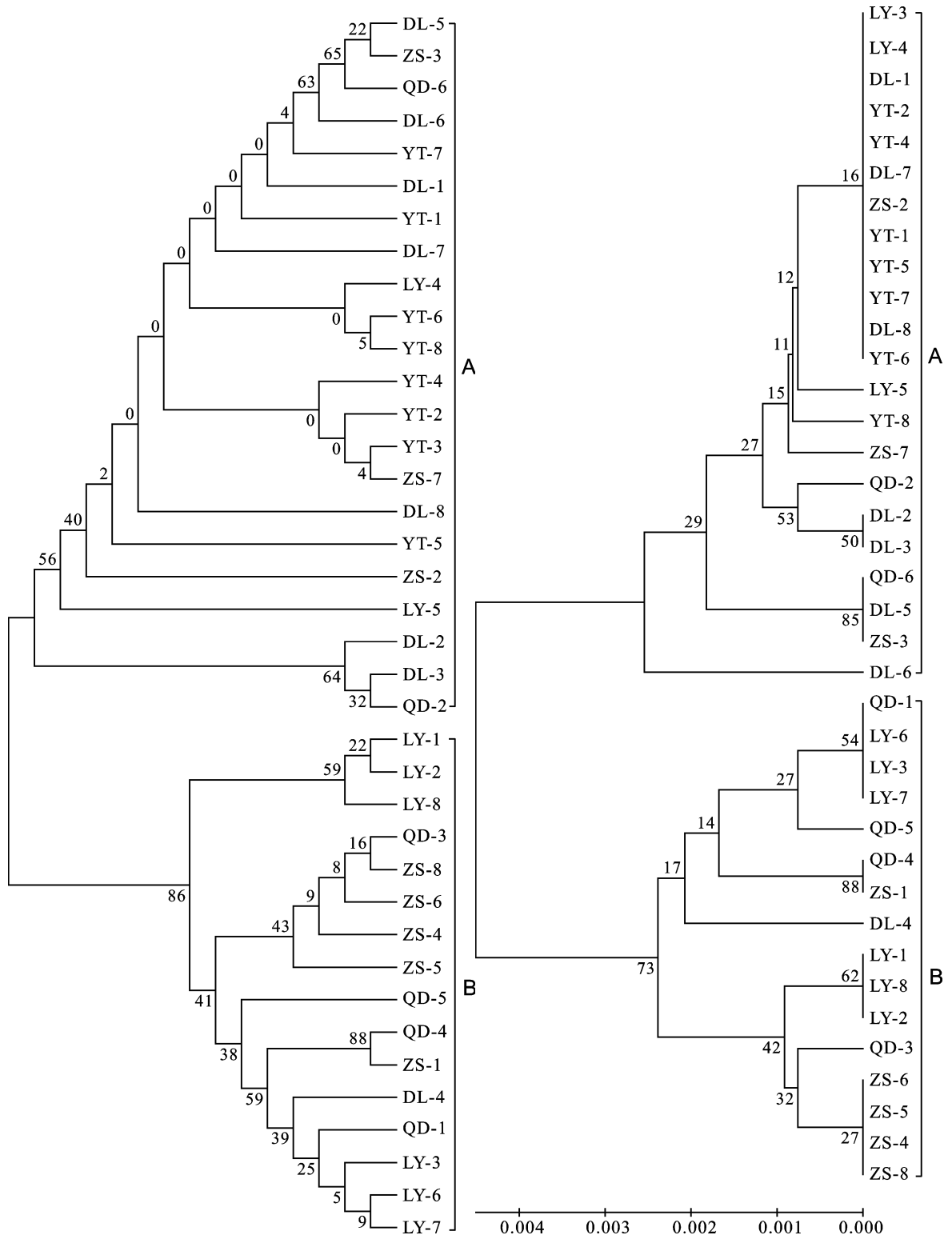


图2 5个地理群体长蛸 COI 序列 NJ 和 UPGMA 分子系统树  
 Fig.2 NJ and UPGMA trees of COI sequence of *O. variabilis* from the five populations

致谢 中国海洋大学齐国山博士、厦门大学黄兆斌硕士等在本研究的样品采集中给予帮助, 谨致谢忱。

参 考 文 献

付 景, 张迎春, 2006. 27种瓢虫 mtDNA-COI 基因序列分析及

- 系统发育研究(鞘翅目: 瓢虫科. 昆虫分类学报, 28(3): 179—186
- 孙同秋, 曾海祥, 柴晓贞等, 2008. 长蛸的生物学特性和室内暂养技术. 齐鲁渔业, 25(4): 33—34
- 杨学明, 郭亚芬, 蒋钦杨等, 2006. 三个群体罗氏沼虾线粒体 COI 基因的遗传多样性分析. 上海海洋大学学报, 15(2): 144—149
- 张凤英, 马凌波, 施兆鸿等, 2008. 3 种鲷属鱼类线粒体 COI 基因序列变异及系统进化. 中国水产科学, 15(3): 392—399
- 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. 厦门大学学报(自然科学版), 47(2): 268—273
- 程汉良, 夏德全, 吴婷婷等, 2007. 6 种帘蛤科贝类及 4 种地理种群文蛤线粒体 COI 基因片段序列分析. 海洋学报, 29(5): 109—116
- Excoffier L, Laval G, Schneider S, 2005. Arlequin ver.3.01: An integrated software package for population genetics data analysis. Evolutionary Bioinformatics Online, 1: 47—50
- Harrison J S, 2004. Evolution, biogeography, and the utility of mitochondrial 16S and COI genes in phylogenetic analysis of the crab genus *Austinia* (Decapoda: pinnotheridae). Mol Phylogenet Evol, 30: 743—754
- Inaba A, 1959. Notes on the chromosomes of two species of octopods (Cephalopoda, Mollusca). Jap J Genet, 34: 137—139
- Kumar S, Tamura K, Nei M, 2004. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. Briefings in Bioinformatics, 5: 150—163
- Lin Xiangzhi, Zheng Xiaodong, 2004. Phylogeny of the cuttlefishes (Mollusca: Cephalopoda) based on mitochondrial COI and 16S rRNA gene sequence data. Acta Oceanologica Sinica, 23(4): 699—707
- Martínez-Navarro E M, Galián J, Serrano J, 2005. Phylogeny and molecular evolution of the tribe *Harpalini* (Coleoptera, Carabidae) inferred from mitochondrial cytochrome-oxidase I. Molec Phylogenet Evol, 35: 127—146
- Rozas J, Sanchez-DelBarrio J C, Messeguer X *et al*, 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. Bioinformatics, 19(18): 2496—2497
- Wells M J, Wells J, 1995. The control of ventilatory and cardiac responses to changes in ambient oxygen tension and oxygen demand in octopus. Journal of Experimental Biology, 198(8): 1717—1727

## SEQUENCE AND MOLECULAR PHYLOGENY OF MITOCHONDRIAL COI GENE FRAGMENT IN FIVE POPULATIONS OF *OCTOPUS VARIABILIS* IN CHINA

SUN Bao-Chao<sup>1,2</sup>, YANG Jian-Min<sup>1,2</sup>, SUN Guo-Hua<sup>1</sup>, LIU Xiang-Quan<sup>1</sup>,  
LIU Li-Juan<sup>1</sup>, WANG Wei-Jun<sup>1</sup>, ZHENG Xiao-Dong<sup>3</sup>

(1. Shandong Marine Fisheries Research Institute, Yantai, 264006; 2. Shanghai Ocean University, Shanghai, 201306;  
3. Ocean University of China, Qingdao, 266003)

**Abstract** Mitochondrial COI gene fragments of wild *Octopus variabilis* were amplified with PCR; the PCR products were purified and sequenced, and 658bp nucleotide sequences were obtained. The T, C, A, and G contents in this fragment were 37.02%, 18.46%, 30.15%, and 14.35%, respectively. The AT content was higher than the GC content. 18 variable nucleotide positions were detected in 658bp COI sequences analyzed; 15 haplotypes are defined among five populations, of which only 4 were common. Among the five populations, Qingdao (QD) shows the best genetic diversity. The Kimura 2-paramter genetic distance calculated by the MEGA version 3.1 between the population of Dalian (DL) and QD is the highest, up to 0.0077, while that between the populations of Dalian (DL) and Yantai (YT) is the lowest at 0.0029. The fixation indices ( $F_{st}$ ) analyzed by AMOVA of ARLEQUIN Version 3.11 totaled to 0.17410 ( $P < 0.05$ ), showing that the genetic fixation intra-populations is much larger than that inter-populations. The Neighbor-joining (NJ) phylogenetic tree and UPGMA phylogenetic tree were made from the five populations of *O. variabilis*. The result shows that the population of DL, YT might have originated from one clade, while population of QD, LY and ZS from another.

**Key words** *Octopus variabilis*, COI gene, PCR, Genetic diversity