

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2011.00245

中国近海习见头足类 DNA 条形码及其分子系统进化

王鹤^{1,2}, 林琳^{2,3}, 柳淑芳², 姜志强¹, 庄志猛²

1. 大连海洋大学 农业部海洋水产增养殖学重点开放实验室, 辽宁 大连 116023;

2. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东省渔业资源与生态环境重点实验室, 山东 青岛 266071;

3. 厦门大学 海洋环境学院, 福建 厦门 361005

摘要: 应用 DNA 条形码通用引物扩增了 11 种中国近海习见头足类(Cephalopoda)共计 97 个个体的线粒体细胞色素 C 氧化酶亚基 I(Cytochrome C oxidase I, COI)基因片段, 与 GenBank 收录的 19 种 95 条头足类同源序列进行比对。结果表明, 头足类 COI 基因存在碱基插入缺失现象, 杜氏枪乌贼(*Uroteuthis duvauceli*)插入缺失位点数多达 33 个; 碱基组成偏倚明显, A+T 含量(66.70%)显著高于 G+C (33.30%)含量。基于 Kimura 双参数模型计算, 29 个物种的种内平均遗传距离为 0.007 2, 种间平均遗传距离(0.202 4)是种内遗传距离的 28.11 倍。针对剑尖枪乌贼(*Loligo edulis*, *Uroteuthis edulis*, *Photololigo edulis*)分类和命名的分歧, DNA 条形码分类结果显示, 该物种与枪乌贼属(*Loligo*)和尾枪乌贼属(*Uroteuthis*)的 COI 基因同源性较低, 不支持将其划归到 *Loligo* 或 *Uroteuthis*。近爱尔兰蛸属(*Pareledone*)6 个代表物种的种间遗传距离较小(0.012 0 ~ 0.038 5), 对于此类变异程度较低的物种, DNA 条形码仍可准确区分, 但其种间遗传距离的阈值尚待深入探讨。系统发育树的聚类分析结果表明, COI 基因在种、属水平的分类鉴定及其系统进化关系与传统方法所得结果一致性较高, 分别为 100%、91.67%; 科、目水平的一致性略低, 分别为 80%和 66.67%。可见, 线粒体 COI 基因作为头足类 DNA 条形码在物种鉴定中适用性较高, 亦适用于种属水平的系统进化分析, 是形态学分类系统的必要补充和佐证。[中国水产科学, 2011, 18(2): 245–255]

关键词: 头足类; COI 基因; DNA 条形码; 分类鉴定; 系统进化

中图分类号: Q959

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2011)02-0245-11

头足类(Cephalopoda)是软体动物门头足纲种类的统称, 主要包括柔鱼、枪乌贼、乌贼和蛸四大类, 广泛分布于太平洋、大西洋、印度洋等海域^[1]。头足类具有生命周期短、生长速度快、资源量大、食用价值与药用价值高等特点, 被联合国确定为人类未来重要的蛋白质来源, 世界沿海各国高度重视其资源的开发与利用^[2]。此外, 头足类不仅是小型海洋动物的主要捕食者, 也是大型鱼类和海洋哺乳动物等的重要食物来源, 在高营养层次食物链中的地位举足轻重^[3-5]。

中国头足类资源丰富, 已记录的种类有 125 种, 分属 4 目, 30 科, 61 属^[6]。由于头足类表型的

可塑性, 仅依据角质喙、外套乳状突、体色等外部特征, 种属水平的形态分类鉴定难度较大^[7-8]。

以 DNA 为基础的系统分类新方法之一——DNA 条形码(DNA Barcoding)技术可以弥补传统形态学鉴定的某些局限, 有效实现物种的鉴定、新种和隐存种的发现以及高级阶元演化关系的重建等^[9-12]。本研究以黄海与东海常见头足类为材料, 在形态学分类鉴定的基础上, 测定头足类的线粒体 COI 基因序列, 探讨 DNA 条形码在头足类辅助物种鉴定中的适用性和完善头足类检索系统的可能技术途径, 以期对头足类种质资源保护和近海生态系统食物网结构分析提供技术支撑。

收稿日期: 2010-11-22; 修订日期: 2010-12-24.

基金项目: 国家自然科学基金项目(40776097, 31061160187); 公益性行业(农业)科研专项(200903005).

作者简介: 王鹤(1985-), 女, 硕士研究生, 主要从事海洋生物资源分子生态学研究. E-mail: wanghebird@126.com

通讯作者: 庄志猛, 研究员. E-mail: zhuangzm@ysfri.ac.cn

1 材料与方法

产科学研究院黄海水产研究所海洋渔业生物样品

1.1 实验材料与 DNA 提取

库。参照《中国动物志——头足类》^[13]进行形态

用于本研究的 97 个头足类样品来自中国水

鉴定, 97 个样品划属于 3 目, 5 科, 7 属, 11 种(表 1)。

表 1 实验所选用的头足类 COI 基因信息

Tab. 1 Information for COI genes of Cephalopoda

组别 group	物种 species	分类地位 taxonomy	样品数 numbers of samples	GenBank 序列号 GenBank accession No.
GP1	太平洋褶柔鱼 <i>Todarodes pacificus</i>	枪形目-柔鱼科-褶柔鱼属	10	本研究 this study
GP2	滑柔鱼 <i>Illex illecebrosus</i>	枪形目-柔鱼科-滑柔鱼属	5	DQ373941、DQ373939、 DQ373938、DQ373936、DQ373935
GP3	鸢乌贼 <i>Sthenoteuthis oualaniensis</i>	枪形目-柔鱼科-鸢乌贼属	5	EU310887-EU310883
GP4	火枪乌贼 <i>Loligo beka</i>	枪形目-枪乌贼科-枪乌贼属	7	本研究 this study
GP5	剑尖枪乌贼 <i>Loligo edulis</i>	枪形目-枪乌贼科-枪乌贼属	10	本研究 this study
GP6	日本枪乌贼 <i>Loligo japonica</i>	枪形目-枪乌贼科-枪乌贼属	10	本研究 this study
GP7	长枪乌贼 <i>Loligo bleekeri</i>	枪形目-枪乌贼科-枪乌贼属	5	AB441190-AB441186
GP8	皮氏枪乌贼 <i>Loligo pealei</i>	枪形目-枪乌贼科-枪乌贼属	5	AY207923-AY207919
GP9	普氏枪乌贼 <i>Loligo plei</i>	枪形目-枪乌贼科-枪乌贼属	5	AF207944-AF207940
GP10	莱氏拟乌贼 <i>Sepioteuthis lessoniana</i>	枪形目-枪乌贼科-拟乌贼属	5	本研究 this study
GP11	非洲异尾枪乌贼 <i>Alloteuthis africana</i>	枪形目-枪乌贼科-异尾枪乌贼属	5	EU668070 -EU668066
GP12	异尾枪乌贼 <i>Alloteuthis media</i>	枪形目-枪乌贼科-异尾枪乌贼属	5	EU668096-EU668093 EU668088
GP13	中国锁管 <i>Uroteuthis chinensis</i>	枪形目-枪乌贼科-尾枪乌贼属	5	EU349445-EU349442 EU349437
GP14	真锁管/剑光枪乌贼 <i>Uroteuthis edulis</i>	枪形目-枪乌贼科-尾枪乌贼属	5	EU349462-EU349458
GP15	杜氏枪乌贼 <i>Uroteuthis duvauceli</i>	枪形目-枪乌贼科-尾枪乌贼属	5	EU349463-EU349465、 AF075400、AF075398
GP16	曼氏无针乌贼 <i>Sepiella maindroni</i>	乌贼目-乌贼科-无针乌贼属	15	AF361359-AF361561、AF346853、 AB192341、本研究(this study, 10)
GP17	针乌贼 <i>Sepia andreana</i>	乌贼目-乌贼科-乌贼属	5	本研究 this study
GP18	金乌贼 <i>Sepia esculenta</i>	乌贼目-乌贼科-乌贼属	10	本研究 this study
GP19	商乌贼 <i>Sepia officinalis</i>	乌贼目-乌贼科-乌贼属	5	EF416563-EF416559
GP20	双喙耳乌贼 <i>Sepiola birostrat</i>	乌贼目-乌贼科-耳乌贼属	10	本研究 this study
GP21	短蛸 <i>Octopus ocellatus</i>	八腕目-蛸科-蛸属	10	本研究 this study
GP22	长蛸 <i>Octopus variabilis</i>	八腕目-蛸科-蛸属	10	本研究 this study
GP23	真蛸 <i>Octopus vulgaris</i>	八腕目-蛸科-蛸属	5	FN424381-FN424379 AB430548-AB430547
GP24	等突近爱尔斗蛸 <i>Pareledone aequi- papillae</i>	八腕目-蛸科-近爱尔斗蛸属	5	GQ843880-GQ843876
GP25	白斑近爱尔斗蛸 <i>P.albimaculata</i>	八腕目-蛸科-近爱尔斗蛸属	5	GQ843908-GQ843904
GP26	近爱尔斗蛸 <i>P.aurata</i>	八腕目-蛸科-近爱尔斗蛸属	5	GQ843926-GQ843922
GP27	角突近爱尔斗蛸 <i>P.cornuta</i>	八腕目-蛸科-近爱尔斗蛸属	5	GQ844077-GQ844073
GP28	<i>P.felix</i>	八腕目-蛸科-近爱尔斗蛸属	5	GQ844120-GQ844116
GP29	次近爱尔斗蛸 <i>P.subtilis</i>	八腕目-蛸科-近爱尔斗蛸属	5	GQ844230-GQ844226
Out	纵肋织网螺 <i>Varicinasia variciferus</i>	织网螺科	1	GU393385
Out	中华文蛤 <i>Meretrix petechialis</i>	文蛤属	1	AB280785
Out	文蛤 <i>Meretrix meretrix</i>	文蛤属	1	DQ399402
Out	长牡蛎 <i>Crassostrea gigas</i>	牡蛎属	1	AF280608

取酒精固定的头足类组织样品约 50 mg, 参

照 Sambrook 等^[14]的酚-氯仿抽提法并稍加改进提

取总 DNA。

1.2 PCR 扩增及序列测定

COI 基因扩增引物为 DNA 条形码通用引物

LCO1490(5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATT

GG-3')和 HCO2198(5'-TAAACTTCAGGGTGAC-CAAAAAATCA-3')^[9]。PCR 反应采用 25 μ L 体系, 其中包括上、下游引物各 0.4 μ mol/L, 0.2 mmol/L 的 dNTP, 1 $\times$ buffer, 2 mmol/L MgCl₂, 1U Taq 酶和 10~100 ng DNA 模板。PCR 反应条件为: 94℃ 4 min; 94℃ 1 min, 45℃ 1.5 min, 72℃ 1.5 min, 5 个循环; 94℃ 1 min, 50℃ 1.5 min, 72℃ 1 min, 35 个循环; 最后 72℃ 延伸 5 min^[9]。

PCR 产物纯化后, 由华大基因公司 ABI PRISMTM3730XL DNA Analyzer 测序仪完成序列测定工作, 测序引物为 PCR 扩增引物。

1.3 COI 基因序列信息下载

从 GenBank 筛选出头足类 COI 基因序列信息 95 条, 分别划属于 3 目, 4 科, 7 属, 19 种(表 1)。同时下载纵肋织网螺(*Varicnassa variciferus*)、中华文蛤(*Meretrix petechialis*)、文蛤(*Meretrix meretrix*)、长牡蛎(*Crassostrea gigas*)的 COI 基因序列作为外群比对信息, 构建分子系统树。

1.4 数据分析

用于本研究的 192 条头足类 COI 基因序列逐一与条形码数据库(<http://www.boldsystems.org>)中的参考序列进行比对, 选取匹配程度大于 98% 的序列用于结果分析, 以确保形态鉴定的准确性及下载序列信息的可靠性。用 DNASTAR 和 ClustalX 软件分析已比对验证过的头足类 COI 基因序列^[9], 用 MEGA 4.0 中的 Kimura 双参数法计算种内和种间遗传距离^[15], 采用邻接法(neighbour-joining, NJ)、最大简约法(maximum parsimony, MP)构建进化系统树, 用 DNA SP 5.10 统计单倍型^[16]。

2 结果与分析

2.1 头足类 COI 基因碱基组成

研究所用引物位于 COI 基因 5'端, 扩增片段长度范围为 653~688 bp, 平均 679 bp。将实验获得序列连同 GenBank 下载序列一并比对, 修剪成同一长度 572 bp(含插入缺失位点)进行分析。结果表明, 192 个个体共存在 103 个单倍型, 单倍型变异指数为 0.000 00~1.000 00(平均 0.676 67), 核苷酸多样性为 0.000 00~0.060 50(平均 0.008 02);

29 个物种中 24.14% 的物种存在碱基插入和缺失现象, 共存在 53 个插入缺失位点, 其中, 杜氏枪乌贼(*Uroteuthis duvauceli*-GP15)插入缺失现象最严重, 插入缺失位点数共计 33 个; 多态性位点共计 267 个, 平均每个物种的多态性位点数为 9.206 9 个, 其中杜氏枪乌贼(*Uroteuthis duvauceli*-GP15)的多态性位点数最多(49), 近爱尔斗蛸(*Pareledone aurata*-GP26)和剑尖枪乌贼(*Loligo edulis*-GP5)序列则不存在多态性位点(表 2)。

192 条头足类 COI 序列的平均碱基组成分别为 T: 37.60%、C: 18.50%、A: 29.10%、G: 14.80%, 其中, A+T 含量(66.70%)明显高于 G+C 含量(33.30%), 碱基组成表现出明显的偏倚性。3 个密码子 GC 含量差异较大(表 3), 其中第 1 密码子 GC 平均含量最高, 达 43.00%; 第 2 位密码子次之, 平均为 37.40%, 第 3 密码子最小, 平均仅为 19.40%。

表 4 列出了 COI 序列的核苷酸变异情况。在 572 个位点中, 不变位点有 469 个, 其中第 3 密码子不变位点数最少(123 个), 第 1、2 密码子的不变位点数相当(分别为 174 和 172 个); 转换和颠换位点数分别为 48 和 55 个; 第 3 密码子位点上的转换和颠换频率较高, 转换、颠换频率分别为 14.29%和 20.63%。

2.2 种内及种间遗传距离

应用 MEGA 4.0 中 Kimura 双参数法计算 192 条头足类 COI 基因序列的种内和种间的遗传距离(表 5)。29 个物种的种内平均遗传距离为 0.007 2, 79.31% 的种内遗传距离小于 0.010 0。除杜氏枪乌贼(0.043 9)外, 其他物种的种内遗传距离均小于条形码技术推荐的种内遗传距离 0.020 0。其中, 剑尖枪乌贼和近爱尔斗蛸种内遗传距离最小(均为 0), 短蛸(*Octopus ocellatus*)最大(0.0168)。值得一提的是, 本研究中曼氏无针乌贼(*Sepiella maindroni*)15 个样品分别来自黄渤海(10 个)、中国南海(3 个)和日本海(2 个)等 3 个地理群, 其种内遗传距离为 0.008 8, 与 Hebert^[9]推荐的条形码种内遗传距离数值吻合, 表明 DNA 条形码亦适用于地理分布跨度大的物种甄别。

表 2 29 种头足类 COI 基因序列特征
Tab.2 Characters of COI sequences from 29 species of Cephalopoda

组别 group	样品数量 numbers of samples	单倍型数量 numbers of haplotypes	单倍型变异 haplotype diversity	核苷酸多样性 nucleotide diversity	插入缺失位点数 numbers of insert-deletion sites	多态性位点数 numbers of polymorphic sites
GP1	10	4	0.53300	0.00132	0	3
GP2	5	3	0.70000	0.00245	0	3
GP3	5	4	0.90000	0.00559	0	8
GP4	7	4	0.81000	0.00200	0	3
GP5	10	1	0.00000	0.00000	0	0
GP6	10	7	0.86700	0.01437	0	39
GP7	5	5	1.00000	0.00385	0	5
GP8	5	5	1.00000	0.00524	0	7
GP9	5	5	1.00000	0.00629	0	7
GP10	5	2	0.40000	0.00070	0	1
GP11	5	2	0.40000	0.00070	1	1
GP12	5	4	0.90000	0.00210	0	3
GP13	5	3	0.80000	0.00245	1	3
GP14	5	4	0.90000	0.00245	0	3
GP15	5	3	0.70000	0.04176	33	49
GP16	15	7	0.72400	0.00906	6	28
GP17	5	4	0.90000	0.00210	0	3
GP18	10	4	0.53300	0.00315	0	9
GP19	5	2	0.40000	0.00210	0	3
GP20	10	3	0.37800	0.00210	0	6
GP21	10	4	0.77800	0.01729	1	22
GP22	10	4	0.80000	0.00911	1	17
GP23	5	2	0.60000	0.01573	0	15
GP24	5	3	0.70000	0.00699	0	7
GP25	5	2	0.40000	0.00070	0	1
GP26	5	1	0.00000	0.00000	0	0
GP27	5	4	0.90000	0.01049	0	11
GP28	5	4	0.90000	0.0605	10	7
GP29	5	3	0.70000	0.00210	0	3
平均 average	—	—	0.67666	0.00802	2	9

表 3 29 种头足类 192 个个体的 COI 基因部分序列碱基
平均分布概率

Tab.3 Average nucleotide frequencies of COI partial sequences of 29 Cephalopoda					%
碱基 base	总频率 frequency	密码子第 1 位点 1 st site of codon	密码子第 2 位点 2 nd site of codon	密码子第 3 位点 3 rd site of codon	
T	37.60	30.80	44.10	37.90	
C	18.50	18.50	24.20	12.70	
A	29.10	26.20	18.50	42.70	
G	14.80	24.50	13.20	6.70	

表 4 29 种头足类 192 个个体的 COI 部分序列密码子变
异情况

Tab. 4 Sequence variation of COI gene of 29 Cephalopoda species				
密码子 codon	不变位点(ii) identical pairs	转换位点(si) transitional Pairs	颠换位点(sv) transversional pairs	R= si/sv
Avg	469.0	48.0	55.0	0.8
1 st	174.0	13.0	5.0	0.7
2 nd	172.0	8.0	11.0	0.9
3 rd	123.0	27.0	39.0	0.9

表 5 29 种头足类的种间及种内遗传距离

Tab. 5 Genetic distance within-species and between 29 Cephalopoda species

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
GP1															0.0015
GP2	0.1833														0.0019
GP3	0.1833	0.1862													0.0062
GP4	0.2060	0.1689	0.2211												0.0022
GP5	0.1969	0.1934	0.2255	0.1365											0.0000
GP6	0.2212	0.1799	0.2057	0.0931	0.1587										0.0158
GP7	0.2183	0.2056	0.2435	0.1646	0.1953	0.1890									0.0042
GP8	0.1938	0.2214	0.2062	0.2220	0.2117	0.2135	0.1980								0.0050
GP9	0.2315	0.2305	0.2622	0.2119	0.2080	0.2125	0.2073	0.1645							0.0058
GP10	0.2082	0.1626	0.2105	0.2254	0.2154	0.2201	0.2483	0.2554	0.2486						0.0008
GP11	0.2114	0.1679	0.2063	0.1506	0.1854	0.1696	0.1860	0.1991	0.1955	0.1935					0.0008
GP12	0.2137	0.1476	0.2046	0.1557	0.1661	0.1633	0.1664	0.2025	0.2011	0.1923	0.0752				0.0019
GP13	0.1907	0.2011	0.2271	0.1517	0.1494	0.1618	0.2094	0.1846	0.2187	0.2378	0.1929	0.1750			0.0027
GP14	0.1954	0.1923	0.2239	0.1351	0.0019	0.1571	0.1943	0.2101	0.2101	0.2143	0.1839	0.1646	0.1479		0.0027
GP15	0.1828	0.1759	0.2273	0.1496	0.1471	0.1514	0.1889	0.2056	0.1995	0.2004	0.1636	0.1626	0.1476	0.1457	0.0439
GP16	0.2000	0.1778	0.2227	0.2078	0.2303	0.2086	0.2043	0.2245	0.2150	0.1750	0.1839	0.1896	0.2080	0.2292	0.0088
GP17	0.1889	0.1988	0.2299	0.2555	0.2292	0.2520	0.2332	0.2445	0.2340	0.1816	0.2220	0.2145	0.2295	0.2292	0.0023
GP18	0.2134	0.1825	0.2036	0.1966	0.2144	0.2006	0.2242	0.2336	0.2454	0.1958	0.1978	0.1879	0.2134	0.2133	0.0035
GP19	0.2122	0.2053	0.2276	0.2328	0.2080	0.2219	0.2251	0.2171	0.2275	0.1883	0.2142	0.1998	0.2183	0.2054	0.0023
GP20	0.2032	0.1744	0.2160	0.2050	0.2072	0.1961	0.1923	0.2217	0.2430	0.1905	0.1743	0.1846	0.1977	0.2056	0.0019
GP21	0.2172	0.2187	0.2465	0.2361	0.2359	0.2315	0.2401	0.2684	0.2563	0.1967	0.2268	0.2057	0.2250	0.2348	0.0168
GP22	0.2420	0.2196	0.2144	0.2109	0.2248	0.2173	0.2417	0.2381	0.2278	0.2131	0.1936	0.2063	0.2490	0.2237	0.0102
GP23	0.2381	0.2300	0.2664	0.2008	0.2336	0.2324	0.2251	0.2547	0.2718	0.2542	0.2222	0.2177	0.2378	0.2341	0.0165
GP24	0.2206	0.2028	0.2503	0.2308	0.2698	0.2323	0.2406	0.2389	0.2454	0.2120	0.1855	0.2081	0.2268	0.2681	0.0078
GP25	0.2040	0.1928	0.2275	0.2145	0.2524	0.2196	0.2314	0.2244	0.2432	0.1930	0.1820	0.1918	0.2157	0.2507	0.0008
GP26	0.2163	0.1873	0.2355	0.2166	0.2604	0.2221	0.2310	0.2372	0.2400	0.2026	0.1791	0.1914	0.2179	0.2587	0.0000
GP27	0.2174	0.1908	0.2329	0.2155	0.2591	0.2244	0.2277	0.2322	0.2407	0.2042	0.1860	0.1893	0.2215	0.2575	0.0117
GP28	0.2160	0.1878	0.2440	0.2260	0.2660	0.2364	0.2327	0.2440	0.2606	0.1983	0.1857	0.1929	0.2326	0.2643	0.0066
GP29	0.2092	0.1884	0.2281	0.2249	0.2657	0.2253	0.2369	0.2454	0.2427	0.1930	0.1790	0.1893	0.2310	0.2640	0.0023

续表 5 Tab.5 continued

	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	
GP1															0.0015
GP2															0.0019
GP3															0.0062
GP4															0.0022
GP5															0.0000
GP6															0.0158
GP7															0.0042
GP8															0.0050
GP9															0.0058
GP10															0.0008
GP11															0.0008
GP12															0.0019
GP13															0.0027
GP14															0.0027
GP15															0.0439
GP16	0.2052														0.0088
GP17	0.2176	0.1812													0.0023
GP18	0.2135	0.2028	0.1645												0.0035
GP19	0.2113	0.1747	0.1923	0.2165											0.0023
GP20	0.2035	0.1519	0.1897	0.2011	0.2005										0.0019
GP21	0.2153	0.2184	0.2298	0.2403	0.2533	0.2259									0.0168
GP22	0.2496	0.2189	0.2268	0.2271	0.2344	0.2063	0.1996								0.0102
GP23	0.2279	0.2441	0.2440	0.2747	0.2812	0.2393	0.1721	0.1988							0.0165
GP24	0.2307	0.2091	0.2129	0.2045	0.2400	0.2059	0.1732	0.1857	0.1972						0.0078
GP25	0.2223	0.2071	0.1995	0.1999	0.2270	0.1946	0.1591	0.1692	0.1951	0.0293					0.0008
GP26	0.2285	0.1990	0.2040	0.1942	0.2399	0.1966	0.1586	0.1732	0.1971	0.0248	0.0120				0.0000
GP27	0.2325	0.2104	0.2113	0.2000	0.2336	0.1997	0.1629	0.1764	0.1956	0.0315	0.0195	0.0164			0.0117
GP28	0.2397	0.2127	0.2088	0.1908	0.2405	0.2045	0.1714	0.1805	0.1947	0.0273	0.0279	0.0215	0.0295		0.0066
GP29	0.2337	0.1980	0.2050	0.2036	0.2487	0.1946	0.1562	0.1792	0.1956	0.0361	0.0305	0.0247	0.0330	0.0352	0.0023

29 个物种的种间平均遗传距离为 0.202 4, 是种内遗传距离的 28.11 倍。其中, 隶属于八腕类(Octopoda)的真蛸(*Octopus vulgaris*-GP23)与十腕类(Decapoda)的商乌贼(*Sepia officinalis*-GP19)之间的遗传距离最大(0.281 2), 而八腕目的白斑近爱尔斗蛸(*Pareledone albimaculata*-GP25)与近爱尔斗蛸(*P.aurata*-GP26)之间的种间遗传距离最小(0.012 0)。同属于近爱尔斗蛸属(*Pareledone*)的白斑近爱尔斗蛸、近爱尔斗蛸和角突近爱尔斗蛸(*P.cornuta*-GP27)三者之间的种间遗传距离均小

于 0.020 0。此外, 分类上存在争议的 *Loligo edulis*-GP5 与 *Uroteuthis edulis*-GP14 之间遗传距离也小于 0.020 0。

2.3 头足类分类及系统发育关系

从基于 NJ 法和 MP 法构建的头足类系统发育树(图 1)可见, 2 种方法所构建的系统进化树得到相似的拓扑结构, 但对于不同分类阶元而言, 分子系统关系与传统分类结果不尽相同。在种水平上 NJ 树和 MP 树的分类一致性均为 100%; 属水平上分类与形态分类结果略有差异, 分类一致性为 91.67%,

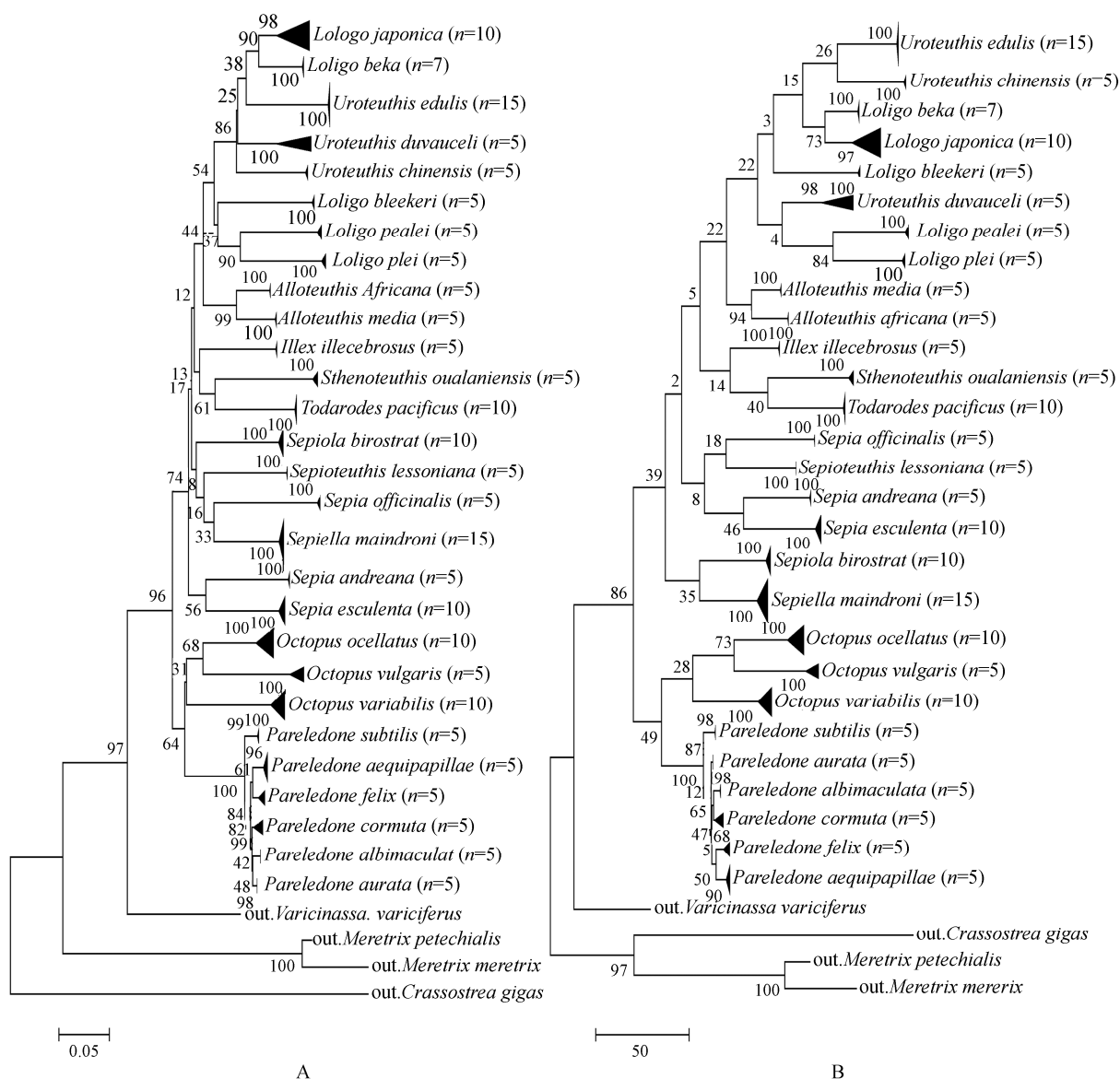


图 1 NJ 法(A)、MP 法(B)构建头足类系统发育树

Fig. 1 NJ (A) and MP (B) tree based on analysis of COI gene data from 29 Cephalopoda species

除目前分类尚存歧义的尾枪乌贼属(*Uroteuthis*)外, 乌贼属(*Sepia*)的商乌贼(*S. officinalis*)、金乌贼(*S. esculenta*)、针乌贼(*S. andreana*)并没有聚在一个分支内; 科水平上与传统分类地位的一致性为 80%, 双喙耳乌贼(*Sepiola birostrat*)本属于耳乌贼科(*Sepiolidae*)但是在 NJ 和 MP 树中却与乌贼科(*Sepiidae*)的曼氏无针乌贼(*Sepilla maindroni*)聚在一起; 目水平上的一致性仅为 66.67%, 莱氏拟乌贼(*Sepioteuthis lessoniana*)没有聚在枪形目(*Teuthoidea*)的分支内, 而与乌贼目(*Sepioidea*)的种类聚在一起。

3 讨论

3.1 头足类线粒体 COI 基因结构特征

由研究结果可见, 头足类 COI 基因存在碱基插入缺失现象。碱基的插入与缺失在软体动物中较为常见^[18-23], 这可能与软体动物进化过程中线粒体拷贝数的变化有一定关联^[24]。有关研究报道认为, 贻贝雄性个体可以得到来自双亲的线粒体 DNA, 并可将其遗传给雄性后代, 但雌性个体只能得到母本的线粒体 DNA 并遗传给雌性后代^[25], 从而造成遗传物质的插入或缺失, 导致碱基数量的变化。头足类 COI 基因碱基组成普遍存在偏倚现象, 相关结果与已有的报道相似, 如曼氏无针乌贼和长蛸的 G+C 含量分别为 31.60% 和 32.83%^[24, 26]。头足类 COI 基因碱基组成偏倚现象符合无脊椎动物线粒体 DNA 碱基组成特点, 虾、蟹、贝的 COI 基因也表现出相似的特性^[25, 28]。

3.2 DNA 条形码在头足类物种鉴定中的适用性和局限性

生物条形码数据库(Barcode of Life Data System, BoLD)作为实现生物条形码计划的载体, 是国际上最权威的生物条形码搜索引擎^[34], 截至 2010 年 9 月已收录了 7 万余条经鉴定可以作为生物条形码信息的序列, 为物种的分子鉴定提供了有效平台。将 GenBank 下载的 95 条 COI 基因序列逐一与 BoLD 的条形码序列信息进行比对, 匹配程度均达 100%; 本研究开发的中国近海 97 条习见头足类 COI 基因条形码序列也逐一与 BoLD 进行比对, 除数据库中未收录的日本枪乌贼和针乌贼外, 比对的信息匹配程度均达 98% 以上, 与

形态学鉴定结果完全吻合, 表明 DNA 条形码在头足类物种鉴定方面具有较高的适用性, 通过条形码基因序列的比对分析即可实现物种的有效鉴定。

多数学者认为, 基于 COI 基因的生物条形码可以较好实现物种鉴定工作, 可望成为物种鉴定的重要工具^[32-33]。但仍有部分学者认为 DNA 条形码存在一定的“错误标签”, 难以完全取代形态学分类方法在分类学上的地位^[30-31]。作者认为, DNA 条形码在头足类物种鉴定方面具有较高的适用性, 但以 COI 基因作为生物条形码仍有许多问题需要解决。一方面, 仅依据一个基因片段难以实现所有物种的鉴定, 尤其对于那些进化速率较慢的、存在杂交等原因导致基因渗透的物种, 则存在误判可能^[10]; 另一方面, BoLD 为开放系统, 条形码信息收录工作正处于完善过程中, 目前尚难以完成所有的物种比对分析工作, 所以应用 DNA 条形码鉴定物种仍需结合形态学或辅以其其他基因进行验证。值得讨论的是, DNA 条形码技术与形态分类方法在头足类种属水平的鉴定一致性较高(种水平 100%、属水平 91.67%), 而科以上水平的一致性略低(科水平 80%、目水平 66.67%), 这也限制了 COI 基因条形码在头足类系统分类中的应用范围。

3.3 头足类系统分类的争议

3.3.1 头足类同种异名现象的 DNA 条形码证据

剑尖枪乌贼(*Loligo edulis* Hoyle, 1885)的分类地位一直存在分歧。Lamarck(1798)将其划归枪乌贼属(*Loligo*), 1945 年 Rehder 根据剑尖枪乌贼具有与尾枪乌贼属(*Uroteuthis*)相似的特征将其属名改为 *Uroteuthis*, 后来 Natsukari 发现其在墨囊附近存在两个发光器, 又将其归到发光枪乌贼属(*Photololigo*)中并更名为剑尖发光枪乌贼(*P. edulis*), 但是这一分类归属并没有得到学术界的普遍认可^[35-37]。在中国大陆地区的分类系统中, 多使用 *Loligo edulis*^[38-39], 台湾地区多使用 *Uroteuthis* (*Photololigo*) *edulis*(<http://taibnet.sinica.edu.tw/>)。Allcock 等^[40]为了弄清该物种的分类归属问题, 用同工酶方法分析了剑尖枪乌贼与其他枪乌贼的

生化遗传结构,发现其与枪乌贼属的代表种真枪乌贼(*Loligo vulgaris*)差异显著,且与同科的尾枪乌贼属、异尾枪乌贼属(*Alloteuthis*)和拟乌贼属(*Sepioteuthis*)存在差异,支持将剑尖枪乌贼划归发光枪乌贼属(*Photololigo*)。本研究结果表明,一是 *Loligo edulis*-GP5, *Uroteuthis edulis*-GP14 的种间遗传距离为 0.0019,在系统发育树中聚为同一分支,应视二者为同种异名;二是剑尖枪乌贼与尾枪乌贼属的杜氏尾枪乌贼(*U. duvauceli*)和枪乌贼属的 5 个种均存在差异,不支持将剑尖枪乌贼划归尾枪乌贼属或枪乌贼属。但由于发光枪乌贼属 COI 序列信息有限,目前还缺乏将剑尖枪乌贼(*Loligo edulis*-GP5, *Uroteuthis edulis*-GP14)划归发光枪乌贼属的直接证据。

3.3.2 DNA 条形码区分物种的阈值 Hebert 等^[7]推荐的生物条形码种间遗传距离阈值为 0.02,多数物种的种间遗传距离远大于 0.02^[9-11, 19, 24-26],但对于那些 COI 基因进化速率较慢的物种,种间遗传距离可能小于该数值。Undheim 等^[5]研究南大洋头足类物种的分类和系统进化时发现,应用 COI 基因序列变异分析能够区分近爱尔斗蛸属的物种,但该属各种间的遗传距离(0.009 ~ 0.037)较小;Allcock 等^[40-43]的研究结果支持上述观点,认为近爱尔斗蛸属的种间遗传距离较小、进化历程复杂,但基于 COI 基因的生物条形码尚可将该属的不同种类予以区分。本研究也发现类似现象,近爱尔斗蛸属 6 个种类的种内遗传距离范围为 0.000 0 ~ 0.017 7,种间遗传距离范围为 0.012 0 ~ 0.036 1,但 6 个物种的不同个体在 MP 和 NJ 树上分别聚成单一分支,表明 COI 基因可有效区分该属不同物种。因此,对于诸如近爱尔斗蛸属此类种内和种间遗传变异较小的物种,其 DNA 条形码区分物种的阈值尚待进一步探讨。

致谢: 黄海水产研究所戴芳群高工和程济生研究员在实验样品采集和物种鉴定方面给予了帮助和指导,实验中的形态学鉴定工作由程济生研究员指导完成;上海海洋大学陈新军教授、刘必林博士在头足类物种学名译文及分类方面给予指导,

在此深表谢忱!

参考文献:

- [1] 陈新军. 世界“头足类”经济资源及其开发利用状况[J]. 世界科学, 2005(3): 25-26.
- [2] 陈新军, 刘必林, 王尧耕. 世界头足类[M]. 北京: 海洋出版社, 2009: 214-257.
- [3] 郑小东, 王如才, 王昭萍. 头足类遗传变异研究进展[J]. 水产学报, 2001, 25(1): 84-89.
- [4] 李圣法, 严利平, 李惠玉, 等. 东海区头足类群居空间分布特征的初步研究[J]. 中国水产科学, 2006, 13(6): 936-944.
- [5] 李建柱, 陈丕茂, 贾晓平, 等. 中国南海北部剑尖枪乌贼资源现状及其合理利用对策[J]. 中国水产科学, 2010, 17(6): 1309-1318.
- [6] 刘瑞玉. 中国海洋生物名录[M]. 北京: 科学出版社, 2008: 598-605.
- [7] Undheim E A B, Norman J A, Thoen H H, et al. Genetic identification of Southern Ocean octopod samples using mtCOI [J]. Mol Biol Gen, 2010, 02(002): 1-10.
- [8] Kassahn K S, Donnellan S C, Fowler A J, et al. Molecular and morphological analysis of the cuttlefish *Sepia apama* indicates a complex structure [J]. Mar Biol, 2003, 143: 947-962.
- [9] Hebert P D N, Cywinska A, Ball S L, et al. Biological identifications through DNA barcodes [J]. Proc R Soc Lond B, 2002, 30: 02PB0653.2-02PB0653.9
- [10] Hebert P D N, Cywinska A, Ball S L, et al. Biological identifications through DNA barcodes[J]. Proc R Soc Lond B, 2003a, 270: 313-322.
- [11] Hebert P D N, Ratnasingham S, deWaard J R. Barcoding animal life:cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species [J]. Proc R Soc Lond B, 2003b, 270: S96-S99.
- [12] 肖金花, 肖晖, 黄大卫. 生物分类学的新动向 DNA 条形码[J]. 动物学报, 2004, 50(5): 852-855.
- [13] 董正之. 中国动物志软体动物门头足纲[M]. 北京: 科学出版社, 1988.
- [14] Sambrook J, Fitch E, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 463-470.
- [15] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment [J]. Briefings in Bioinformatics, 2004, 5: 150-163.
- [16] Rozas J, Sánchez-DelBarrio J C, Messeguier X. DnaSP DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods

- [J]. Bioinformatics, 2003, 19: 2496–2497.
- [17] Jan M, Strugnell A, Lindgren R. A barcode of life database for the Cephalopoda? Considerations and concerns [J]. Fish Biol Fisheries, 2007, 17: 337–344.
- [18] Boore J L. Complete DNA sequence of the mitochondrial genome of the black chiton, *Katharina tunicata* [J]. Genetics, 1994(138): 423–443.
- [19] Boore J L. Animal mitochondrial genomes [J]. Nucleic Acids Res, 1999(27): 1767–1780.
- [20] Lindgren R A. Molecular inference of phylogenetic relationships among Decapodiformes (Mollusca: Cephalopoda) with special focus on the squid Order Oegopsida [J]. Mol Phylogen Evol, 2010, 56: 77–90.
- [21] Tetsuya A, Masato N, Kotaro T, et al. Extensive mitochondrial gene arrangements in coleoid Cephalopoda and their phylogenetic implications [J]. Mol Phylogen Evol, 2006(38): 648–658.
- [22] Brown W M, George J M, Wilson A C. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1979, 76: 967–971.
- [23] Masa-aki Y, Kazuhiko T, Hisetaka F. Phylogeny of selected Sepiidae (Mollusca: Cephalopoda) based on 12S, 16S, and COI sequence, with comments on the taxonomic reliability of several morphological characters [J]. Zoolog Sci, 2006(23): 341–351.
- [24] Zheng X D, Xiao S, Chen B, et al. Study on COI and 16S rRNA gene sequences of the common Chinese cuttlefish *Sepiella maindroni*. Transaction of the Chinese Society of Malacology IX [C]: 64–69.
- [25] Relationships of the Genus *Meretrix* (Mollusca: Veneridae) based on mitochondrial COI gene sequences [J]. Zoolog Res, 2009, 30(3): 233–239.
- [26] 孙宝超, 杨建敏, 孙国华, 等. 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[J]. 海洋与湖沼, 2010, 41(2): 259–265.
- [27] Kozo T. The Cephalopoda *Loligo bleekeri* mitochondrial genome: multiplied noncoding regions and transposition of tRNA Genes [J]. Mol Evol, 2002(54): 486–500.
- [28] Harrison J S. Evolution, biogeography, and the utility of mitochondrial 16S and COI genes in phylogenetic analysis of the crab genus *Austinia* (Decapoda: pinnotheridae) [J]. Mol Phylogen Evol, 2004(30): 743–754.
- [29] Shaw P W, Arkhipkin A I, Adcock G J, et al. DNA markers indicate that distinct spawning cohorts and aggregations of Patagonian squid, *Loligo gahi*, do not represent genetically discrete subpopulations [J]. Mar Biol, 2004, 144: 961–970.
- [30] Laura F, Stefania C, Marina V, et al. Molecular barcoding reveals mislabeling of commercial fish product in Italy [J]. Food Res Internat, 2010(43): 1383–1388.
- [31] Amir Y, Therase A M, Apurva N, et al. The genus *Drosophila* as a model for testing tree and character-based methods of species identification using DNA barcoding [J]. Mol Phylogen Evol, 2010, 08(020): 1–9.
- [32] Alba A, Ivan G P, Ione G, et al. Application of barcoding to Amazonian commercial fish labeling [J]. Food Res Internat, 2010(43): 1549–1552.
- [33] Chandni P K, Doerder F P, Jason C, et al. Barcoding Tetrahymena: discriminating species and identifying unknowns using the Cytochrome oxidase subunit I (cox-1) barcode [J]. Protist, 2010, 03(004): 1–12.
- [34] Dettai A, Lautredou A C, Bonillo C, et al. The actinopterygian diversity of the CEAMARE cruises: Barcoding and molecular taxonomy as a multi-level tool for new findings [J]. Deep-Sea Resarch II, 2010, 05(021): 1–14.
- [35] Vecchione M, Brakoniecki T F, Natsukari Y, et al. A provisional generic classification of the family Loliginidae [J]. Smithsonian Contrib Zool, 1998, 586, 215–222.
- [36] Vecchione M, Shea E, Bussarawit S, et al. Systematics of Indo-West Pacific loliginids [J]. Phuket Mar Biol Cent Res Bull, 2005, 66, 23–26.
- [37] Anderson F E. Phylogenetic relationships among loliginid squids (Cephalopoda: Myopsida) based on analyses of multiple data sets [J]. Zool J Linn Soc, 2000, 130(4): 603–633.
- [38] 董正之. 中国海洋科学研究及开发[M]. 青岛: 青岛出版社, 1993: 23–26.
- [39] 齐钟彦, 马绣同. 黄渤海的软体动物[M]. 北京: 农业出版社, 1989: 246–264.
- [40] Allcock A L, Thorpe J P, Brierley A S, et al. Biochemical genetic evidence supporting the taxonomic separation of *Loligo edulis* and *Loligo chinensis* (Cephalopoda: Teuthoidea) from the genus *Loligo* [J]. Mar Biol, 1996, 127: 97–104.
- [41] Allcock A L, Iain B, Marc E, et al. Cryptic speciation and the circumpolarity debate: A case study on endemic southern ocean octopuses using the COI barcode of life [J]. Deep-Sea Res II, 2010, 05(016): 1–8.
- [42] Allcock A L, Strugnell J M, Prodohl P, et al. A new species of *Pareledone* (Cephalopoda: Octopodidae) from Antarctic Peninsula Waters [J]. Polar Biol, 2007, 30: 883–893.
- [43] Allcock A L. On the confusion surrounding *Pareledone charcoti* (Joubin, 1905) (Cephalopoda: Octopodidae): endemic

- radiation in the Southern Ocean [J]. Zool J Linn Soc, 2005, 143: 75–108.
- [44] 郑元甲, 凌建忠, 严利平, 等. 东海区头足类资源现状与合理利用的探讨[J]. 中国水产科学, 1999, 6(2): 52–56.
- [45] 程济生. 黄海针乌贼的渔业生物学及其资源状况的初步研究[J]. 中国水产科学, 1997, 4(5): 22–28.

DNA Barcoding for Cephalopoda in classification and phylogeny

WANG He^{1,2}, LIN Lin^{2,3}, LIU Shufang², JIANG Zhiqiang¹, ZHUANG Zhimeng²

1. Key Laboratory of Mariculture and Biotechnology, Ministry of Agriculture, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China;
2. Key Laboratory for Fishery Resources and Eco-environment, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences Qingdao, Qingdao 266071, China;
3. College of Oceanography and Environmental Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China

Abstract: The mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit I genes (CO I) were sequenced from 97 individuals out of 11 common species of Cephalopoda in China by using the universal barcoding primers. The 97 sequences were compared with the other 95 homologous sequences belonging to 19 species of Cephalopoda obtained from the GenBank. As a result, 23.33% of the Cephalopoda species' COI sequences included Insert-Deletion sites. The indels of COI sequences in *Uroteuthis duvauceli* counted up to 33. The COI sequences of Cephalopoda present the base preference. On average, the content of A+T (66.70%) was significantly higher than that of G+C (33.30%). As calculated by Kimera-2-parameter model, the mean distance pairwise-species and within-species was 0.202 4 and 0.007 2, respectively. The valid name and taxonomy of swordtip squid (*Loligo edulis* or *Uroteuthis edulis* or *Photololigo edulis*) remain controversial or unresolved. Here data gathered using COI genes does not support the assertion that swordtip squid should position in the genera of *Loligo* and *Uroteuthis*. In view of the fact that small genetic distance (0.012 0–0.038 5) among 6 species of *Pareledone* is found, suggesting that the threshold of barcodes (0.02) to identify species be worth furthering studies, particularly for those species with low genetic variation. According to maximum parsimony and neighbor joining trees for all 192 sequences of Cephalopoda, the consistency with morphological classification on both species and genus levels was much higher (100%, 91.67%) than that of family or order levels (80%, 66.67%). Consequently, providing essential revision and supplement to morphology taxonomy, the COI barcoding is a useful tool for both identification and phylogeny of Cephalopoda. [Journal of Fishery Sciences of China, 2011, 18(2): 245–255]

Key words: Cephalopoda; COI gene; DNA Barcoding; taxonomy; phylogeny

Corresponding author: ZHUANG Zhimeng. E-mail: zhuangzm@ysfri.ac.cn