

· 综述 ·

线粒体 DNA 标记在头足纲动物分子系统学中的应用

郑小东^{1*}, 马媛媛¹, 程汝滨²

(1. 中国海洋大学水产学院 山东 青岛 266003;

2. 浙江中医药大学药学院 浙江 杭州 310053)

摘要: 动物线粒体 DNA (mtDNA) 具有在细胞中大量存在、缺少重组、多为母系遗传、缺少内含子以及进化速率高等特点, 广泛应用于比较和进化基因组、种群遗传、物种鉴定和不同分类水平上的系统发生学研究。头足类作为软体动物门中的重要经济种类, 其分类和系统进化研究历来是热点领域。本研究主要对头足类动物 mtDNA 组成与特点 (包括基因组成、重排等)、常用 mtDNA 标记对其不同分类阶元的适用性以及线粒体基因片段和全基因组在头足类系统演化中的作用进行了阐述, 并对其未来发展进行展望。

关键词: 头足类; 线粒体 DNA; 分子系统学; 细胞色素氧化酶 I 亚基基因; 细胞色素 C 氧化酶 III 亚基基因; 核糖体 12S rRNA 基因; 核糖体 16S rRNA 基因

中图分类号: Q 244; S 917.4

文献标志码: A

头足类 (Cephalopods) 为软体动物门 (Mollusca) 的第三大纲, 现存种类有 800 多种^[1]。我国已知头足类分为 2 亚纲、5 目、9 科, 共计 135 种^[2], 俗称章鱼、乌贼、鱿鱼、鹦鹉螺等, 多为重要海洋经济种类^[3]。作为无脊椎动物中最为高等的类群, 头足纲动物一直是行为学、生理学和神经生物学等研究领域的模式生物^[4]。

头足类物种繁多, 物种分类和进化研究历来是人们争论的焦点, Roper 等^[5]将鞘亚纲分为枪形目 (Teuthoidea)、乌贼目 (Sepioidea)、幽灵蛸目 (Vampyromorpha) 和八腕目 (Octopoda), Young

等^[6]和 Boletzky 等^[7]将鞘亚纲划分十腕总目 (Decapodiformes) 和八腕总目 (Octopodiformes), 不同的是后者支持将幽灵蛸目从八腕总目中独立出来 (图 1)。长期以来, 头足类的系统发育研究主要依据形态学特征^[8], 由于这些特征可塑性强, 近缘种间差异细微, 幼体与成体、活体与固定样品差异明显等, 造成物种鉴定存在诸多困难, 尤其是亲缘关系较近的种类, 同物异名现象严重, 如砂蛸 (*Amphioctopus aegina*) = 弯斑蛸 (*Octopus dollfusi*), 日本无针乌贼 (*Sepiella japonica*) = 曼氏无针乌贼 (*S. maindroni*)^[9]。

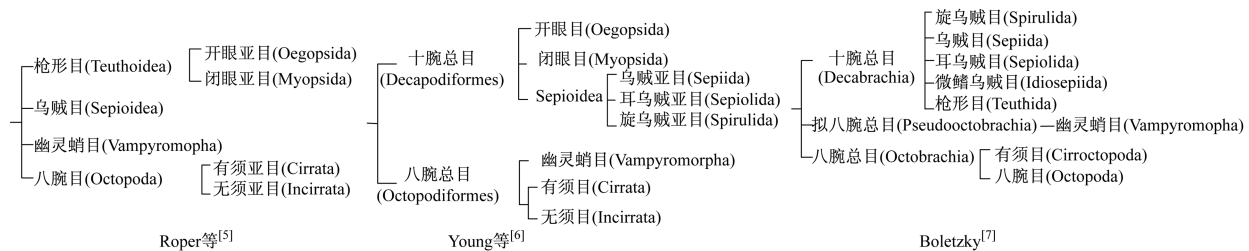


图 1 鞘亚纲的分类

Fig. 1 Classification of Coleoidea

收稿日期:2014-10-21 修回日期:2014-11-24

资助项目:国家自然科学基金(31172058);中央高校基本科研业务费专项(201362022)

通信作者:郑小东, E-mail: xdzheng@ouc.edu.cn

线粒体 DNA (mtDNA) 是一类广泛存在于生物体内的核外遗传物质,具有进化快、结构简单及含量丰富等特点,是系统学研究中常用的分子标记。同时,线粒体基因组是研究其复制、转录、调控和重排等进化机制的良好模型,也是研究真核细胞核酸与蛋白质合成等问题有利的模型系统^[10]。近年来,随着人们对线粒体基因组研究的不断深入,如线粒体基因组的特性、线粒体遗传密码的独特性以及细胞遗传的双重控制因素等问题也逐步得到了揭示。目前,线粒体基因组不仅成为研究物种的种群遗传结构、杂交、物种鉴定、分子生物系统地理和分子系统发生等方面重要的分子遗传标记^[10-13],同时也成为比较与进化基因组学、基因组学及生物信息学等领域的研究热点^[14]。

本研究将对 mtDNA 在头足类纲动物分子系统学中的应用展开综述。

1 头足类 mtDNA 组成和特点

头足类动物 mtDNA 为双链共价闭合环状结构分子,可分为重链(H链或 GC链)和轻链(L链或 AC链)。与其他软体动物相比,头足类 mtDNA 全长为 15~20 kb,mtDNA 共编码 37 个基因,包括 13 个蛋白编码基因 (protein coding genes)、22 个转运 RNA 基因 (transfer RNA gene, tRNA)、2 个核糖体基因 (ribosomal RNA gene, rRNA) 和非编码区 (non coding region, NCR)^[15]。13 个蛋白编码基因为 1 个细胞色素 b 基因 (Cytb)、2 个 ATP 酶亚基基因 (ATP6 和 ATP8)、3 个细胞色素氧化酶亚基基因 (COI-COIII) 以及 7 个 NADH 辅酶基因 (ND1-ND6, ND4L)。

非编码区 (NCR) 是 mtDNA 变化最复杂,鲜被了解,又是最吸引人的区域。NCR 长度的变异可能会影响到 mtDNA 的复制和转录,从而影响整个生物体的代谢速率。对 NCR 结构功能的研究将有助于了解 DNA 的复制、转录机制和进化的规律。非编码区中,存在一个主要非编码区 (或 AT 富含区),称为最大非编码区。Akasaki 等^[8]在对大洋种类主要非编码区的研究中发现,同一个体的 mtDNA 中存在 2 个或 2 个以上不相连却几乎完全相同的非编码序列,如长枪乌贼 (*Loligo bleekeri*) 的 3 个 NCR 序列间的相似度分别为 96.5%、97.8% 和 95.7%^[16];金乌贼 (*Sepia esculenta*) 和 *S. officinalis* 内具有 2 个相似度高达

97.7% 的 LNCR (仅有 13 bp 不同)^[17]。头足类 NCR 中共有 6 个保守序列,其中 3 个为多数头足类所共有,分别为 *motif-1*、*motif-4*、*motif-6*、*motif-1* 为目前已报道所有头足类的保守序列,可能与复制及转录起始点有关^[17]。*motif-2* 序列在十腕类和蛸类中被发现,而 *motif-3* 和 *motif-5* 序列在十腕类中很保守^[8]。

头足类线粒体的蛋白质编码基因和 tRNA 基因存在序列重复甚至基因重复现象,如太平洋褶柔鱼 (*Todarodes pacificus*) 和萤乌贼 (*Watasenia scintillans*) mtDNA 有 18 个蛋白质编码基因、23 个 tRNA 编码基因,复制单元有 COI、COII、COIII、ATP8 和天冬氨酸转运 RNA (aspartic acid tRNA, *trnD*)^[10,18]。此外,头足类 mtDNA 的重排现象十分普遍,尤其在十腕类中,Akasaki 等^[8]报道同属枪乌贼科 (Loliginidae) 的莱氏拟乌贼 (*Sepioteuthis lessoniana*) 和长枪乌贼基因排列方式明显不同。研究表明 tRNA 基因比其他线粒体基因更易发生转位,因而头足类线粒体基因的重排主要发生在 tRNA 簇中^[17]。不同生物线粒体基因组成和排列方式 (包括基因相对位置及非编码区结构),对于亲缘关系较远的系统发生学和群体遗传学研究极有意义,mtDNA 排列的变化率远远低于基因中碱基的置换率,通过比较 mtDNA 图谱能够较好地分析动物进化过程^[19]。

2 mtDNA 在头足类分子系统学研究中的应用

mtDNA 序列是研究种、属,甚至科目间系统发育关系较好的分子标记,以 COI、COIII、12S rRNA (12S) 及 16S rRNA (16S) 应用频率较高,几乎涵盖了头足纲的所有目,本研究分析了常用基因在不同分类阶元中的适用性 (表 1)。

2.1 COI 基因及其应用

COI 基因密码子第 3 位碱基几乎不受自然选择压力的影响,变异大,足够的变异性能将物种区分开。在过去的十年中,基于线粒体 COI 基因的 DNA 条形码已经在动物分类学研究中获得了广泛的认可。目前,COI 作为条形码在头足类的应用主要集中在系统发育和近缘种的鉴定。

物种鉴定 在头足类中,基于 COI 基因的 DNA 条形码显示了其在物种鉴定和发现隐存种上的有效性^[32-33]。Amor 等^[34]利用 5 个 mtDNA 基

因(*COI*、*COII*、12S、16S及*Cytb*)分析了澳大利亚东、西部“*tetricus complex*”,发现在两地区的*Octopus tetricus*出现了较大分化,暗示可能存在隐存种。Sin等^[35]利用*COI*和16S序列数据对形态特征相似的中国枪乌贼[*Uroteuthis (Photololigo) chinensis*]和剑尖枪乌贼[*U. (P.) edulis*]进行鉴定,结果显示这2种标记均能将两种枪乌贼区分开。Allcock等^[32]利用*COI*序列对采自南极附近9个海域的350个爱尔兰斗蛸属(*Pareledone*)头足类进行研究,认为*COI*条形码信息库,将是鉴定爱尔兰斗蛸类物种的有效工具,并能发现隐存种。王鹤等^[36]采用*COI*通用引物扩增了11种中国近海习见头足类,并将得到的97条序列与GenBank收录

的19种95条同源序列进行比对,结果表明*COI*基因作为头足类DNA条形码在物种鉴定中适用性较高,是形态学分类的有效补充和佐证。Dai等^[25]发现火枪乌贼[*Loliolus (Nipponololigo) beka*]在*COI*构建的系统发育树上形成了2个分支,并具有较大的种内遗传差异,这一结果显示火枪乌贼中可能存在隐存种。Zheng等^[26]依据形态学和*COI*序列,确认小孔蛸属的1个新种—中国小孔蛸(*Cistopus chinensis*)。Braid等^[37]利用*COI*、16S和12S序列分析了8种Mastigoteuthid开眼鱿类,支持形态学将其划分为*Mastigoteuthis*、*Idioteuthis*、*Mastigopsis*、*Echinoteuthis*和*Magnoteuthis*5属,并发现了隐存种。

表1 线粒体基因在头足纲分子系统学中的应用

Tab.1 Mt genes' application in phylogenetic analysis of Cephalopods

作者 authors	序列名称 sequence name	亚纲 subclass	目 order	科 family	属 genus	种 species	种群 population
Winkelmann ^[20] 等;Cheng等 ^[21]	mtDNA 基因组	*	*	*	*	*	*
Strugnell等 ^[22-23]	12S	*	*	*	*	*	*
Allcock等 ^[9] ;Piertney等 ^[24]	16S			*	*		
Dai等 ^[25] ;Zheng等 ^[26]	<i>COI</i>				*	*	*
Bonnaud等 ^[27]	<i>COII</i>					*	*
Guzik等 ^[28]	<i>COIII</i>				*	*	*
Espiñeira等 ^[29]	<i>Cytb</i>					*	
Staaf等 ^[30]	<i>ND2</i>					*	
Yoshida等 ^[31]	<i>NDS</i>					*	*

属间/内系统发育 在十腕类的系统学研究中,Anderson^[38]将*COI*及16S序列应用于枪乌贼科(Loliginidae)内的系统学分析,支持枪乌贼类为单系发生;Carlini等^[39]比较*COI*序列,确定了北大西洋滑柔鱼属的分类地位。

八腕目(Octopoda)头足类是系统发育研究中较为困难的类群。Carlini等^[40]利用657bp*COI*序列探讨了28种八腕类系统发育关系,结合形态数据和分子数据,建立了八腕目的系统发育树,聚类结果并不支持传统发生学中蛸科(Octopodidae)为单系发生的观点。许多学者支持这一观点,明确提出蛸科为并系群^[21,28]。

Kaneko等^[41]采用*COI*和*COIII*研究了日本及相邻沿海7属34种八腕类,将1个丽蛸属(*Callistoctopus*)、4个蛸科和1个*Enteroctopus*组成“*Enteroctopus group*”。Dai等^[25]获得了6科14属33种头足类的126个个体的*COI*序列,验证*COI*作为DNA条形码对物种鉴别的有效性,

并指出所采集的3个蛸属、2个小孔蛸属和5个类蛸属(*Amphioctopus*)彼此亲缘关系近于长蛸(*Octopus minor*)。

2.2 *COIII* 基因及其应用

头足类中,*COIII*基因长度约780bp,编码226~243个氨基酸,在mtDNA中比较保守,本标记常联合其他mtDNA基因、核基因及形态数据分析属/种阶元水平的系统关系。

Sosa等^[42]测得612bp*COIII*基因序列,分析了太平洋东北海域5种蛸的系统发育关系,不同的分析方法得到一致结果,同时指出*COIII*标记能有效识别种内亲缘关系。Guzik等^[28]利用线粒体*COIII*基因、*Cyt b*基因和核基因分析了深海蛸类近缘属间的系统发育关系,强烈支持蛸科为并系群。Söller等^[43]和Warnke等^[44]采用*COIII*和16S分析了地中海、大西洋、南非、巴西的南、北和中部及加勒比海等海区的13个真蛸群体,系统树拓扑结构显示它们为同一物种;Guerra等^[45]利用

COIII 和 *COI* 基因进一步研究了印度洋中、南部各岛屿的真蛸分布,遗传距离相近,差异不明显。结合上述研究结果,现认为真蛸为世界广布种。

2.3 线粒体 rRNA 基因及其应用

线粒体中有 2 种 rRNA 基因,分别是 12S 和 16S,进化速率缓慢,较保守,以替换为主,常被用作扩增基因。头足类研究中,主要适用于高级分类阶元和远源物种亲缘关系的分析。

Bonnaud 等^[46-47]测得乌贼目、耳乌贼目和枪形目头足类的 16S 和 *COIII* 基因,探讨乌贼和鱿鱼间的系统发生关系。Zheng 等^[48]用 16S 和 *COI* 序列研究了无针乌贼 (*Sepiella maindroni*) 5 个自然群体,得出该群体间遗传距离相当接近,彼此没有明显的遗传差异。

Lindgren 等^[49]用 12S、16S 和 *COI* 序列研究了枪鱿目手钩鱿科 (Gonatidae) 14 个种的系统发生关系,将手钩鱿科分为 2 个类群,其中一类为齿舌均由 7 列纵向齿组成的原始种类,主要为 *Berryteuthis* (*B. magister* 和 *B. anonychus*) 及 *Gonatopsis* (*G. borealis* 和 *G. sp.*),另一类齿舌由 5 列纵向齿组成的进化种类,其中绝大多数起源于 *B. anonychus*。

在八腕目系统学研究中,Allcock 等^[9]利用 16S 研究了南极洲八腕目无须蛸类的系统发育关系,认为 Eledoninae 亚科、Graneledoninae 亚科和 *Paredone* 属均为并系群,区分了形态学相似物种;Piartney 等^[24]利用 16S 分析有须类各科之间的关系,结果支持形态学上基于腕间膜形状对有须类的划分,并将有须八腕目划分为 4 个科: *Grimptoteuthidae*、*Cirroteuthidae*、*Opisthoteuthidae* 和一个新科(只有一属 *Cirroctopus*)。

Takumiya 等^[50]结合 16S、12S 和 *COI* 基因序列探讨日本海域鞘亚纲几个类群间的系统发育关系,得出八腕类和十腕类为单系群,其中 *Opisthoteuthis* 和扁船蛸 (*Argonauta argo*) 分化较早,进而将日本海域习见八腕类分为 3 个类群:第一类为位于系统树基部的大型蛸类,如 *Enteroctopus dofleini* 与 *Octopus conispadiceus*;第二类为长腕类,如 *O. ornatus*、*O. minor* 和 *O. sasakii*;第三类为中小型蛸,如 *Amphiocopus fangsiao*、*A. areolatus*、*O. cyaneus* 和 *O. vulgaris*,此类群与第二类为姊妹群。十腕类的系统关系为枪形目(开眼亚目 + 闭眼亚目) + 乌贼目[(拟耳乌

贼科 *Sepiadariidae* + 耳乌贼科 *Sepiolidae*) + 乌贼科]。

此外,头足类动物的分子系统学研究中常采用 mtDNA 标记与核基因结合的方法。Strugnell 等^[23]利用 3 个 mtDNA 基因 (12S、16S、*COI*)、3 个核基因 (*rhodopsin*, *pax6*, *ODH*) 及形态学特征分析了 30 种蛸类,联合分析结果表明八腕目比十腕目头足类更为高等,蛸科并系发生,底栖蛸类 *Benthoteuthis* 和 *Enteroteuthis* 亲缘关系更近。Strugnell 等^[22]利用 4 个 mtDNA 基因 (12S、16S、*COIII* 和 *Cytb*) 和 1 个核基因 (*rhodopsin*),研究了深海蛸类的进化关系,表明 *Enteroteuthis dofleini* 与 *Benthoteuthis* 亲缘关系较远。Lindgren^[51]测得 90 个十腕总目头足类 5 个基因 [16S、18S rRNA (18S)、*COI*、28S rRNA 和 *Histone H3*] 序列,结果表明闭眼类 (Myopsida) 和 Sepioids 具有较近的亲缘关系,对开眼类的研究中既得到了与传统分类相一致的结论 (如 *Chiroteuthidae*, *Lepidoteuthidae*, *Histioteuthidae*), 又发现新的分类关系 (如 *Architeuthidae* 和 *Neoteuthidae*)。

2.4 其他 mtDNA 基因

研究认为 *COII*、*Cytb* 是 mtDNA 中相当保守的区段, *ND3*, *ND2* 和 *ATP8* 进化速率最快^[18]。目前, *COII*^[27]、*Cytb*^[29] 及 *ND5*^[31] 各有一些报道,而 *ND1* 基因少有报道,在无脊椎动物中系统学分析中常见的 *ND4* 基因,在头足类中尚无报道。

Staaf 等^[30]将 *COII* 基因用于柔鱼科 (*Ommastrephidae*) 群体水平的分析; Espiñeira 等^[29]将 *Cytb* 基因用于 4 科 30 种头足类,完成物种鉴定; Takemoto 等^[52]利用 *ND1* 基因序列用于 2 种剑尖枪鱿 (*Loligo edulis* forma *kensaki*) 和 *L. edulis* f. *budo* 单倍型分析; Yoshida 等^[31]测得 *COI*、*Cytb* 和 *ND5* 序列,系统树结果显示乌贼 (*Sepia officinalis*) 和无针乌贼 (*Sepiella japonica*) 亲缘关系较近,与亚热带暖水种类白斑乌贼 (*S. latimanus*) 关系较远,这一结果与 Bonnaud 等^[27]和 Lindgren 等^[53]结论一致。

2.5 线粒体全序列及其应用

随着测序技术的发展,获得线粒体全基因 mtDNA 组成为可能,而 mtDNA 全序列和排列信息已被证明是研究种及种以上系统学研究的有力工具^[54]。头足类中,2001 年最先报道了长枪乌贼线粒体全基因组^[16,55],目前 GenBank 已收录了

28 种头足类 mtDNA 的全序列(表 2),其中八腕目 6 种,乌贼目 8 种,枪形目 10 种,幽灵蛸目、耳乌贼目、微鳍乌贼目和鹦鹉螺目各 1 种。它们的分子量大小在 15 706 ~ 20 332 bp 之间,其中枪鱿目 mtDNA 最长,均值为 20 257 bp;八腕目最短,均值为 15 871 bp。

十腕类的系统学研究中,Akasaki 等^[8]测得 5 种鞘亚纲(Coleoidea) mtDNA 全基因组,基于全部蛋白质编码基因信息探讨乌贼目、枪形目和八腕目头足类的系统发育关系,乌贼目位于系统树的基部,为十腕目分化较早的一支,开眼类和闭眼类为一个单系群,支持了枪形目的传统分类。

Yokobori 等^[17]利用全序列对 10 种鞘亚纲头足类构建了系统树,闭眼类中的长枪鱿和莱氏拟乌贼、开眼类中的萤鱿和太平洋褶鱿各自聚为一支,支持枪形目可划分为开眼类与闭眼类,聚类结果支持乌贼目和枪形目进化关系较近。Takemoto 等^[52]对比了 *L. edulis* forma *kensaki* 和 *L. edulis* f. *budo* 系统关系,核苷酸序列和 *ND1* 基因单倍型分析结果均表明 2 种枪鱿具有相似的进化历程。通过比较 mtDNA 基因排列方式,同样可以进行系统进化分析,如金乌贼和 *S. officinalis* 基因结构相似,亲缘关系较近。

表 2 已测定线粒体 DNA 全序列的头足类动物
Tab. 2 The occurrence mitochondrial genomes of cephalopods

目 order	科 family	物种 species	序列长度/bp sequence	GenBank ID	作者 authors	
鹦鹉螺目 Nautilida	鹦鹉螺科 Nautilidae	鹦鹉螺 <i>Nautilus macromphalus</i>	16 258	NC_007980	Boore ^[10]	
乌贼目 Sepioidea	乌贼科 Sepiidae	澳洲乌贼 <i>Sepia apama</i>	16 184	AP013073	Kawashima 等 ^[56]	
		金乌贼 <i>Sepia esculenta</i>	16 199	AB266516	Yokobori 等 ^[17]	
		白斑乌贼 <i>Sepia latimanus</i>	16 225	NC_022467	Kawashima 等 ^[56]	
		拟目乌贼 <i>Sepia lycidas</i>	16 244	NC_022468	Kawashima 等 ^[56]	
		乌贼 <i>Sepia officinalis</i>	16 163	AB240155	Akasaki 等 ^[8]	
		虎斑乌贼 <i>Sepia pharaonis</i>	16 208	KC632521	Kawashima 等 ^[56]	
		尹纳无针乌贼 <i>Sepiella inermis</i>	16 191	NC_022693	Wang 等 ^[57]	
		无针乌贼 <i>Sepiella japonica</i>	16 172	NC_017749	Takemoto 等*	
微鳍乌贼目 Idiosepiida	微鳍乌贼目 Idiosepiidae	<i>Idiosepius</i> sp.	16 183	KF647895	Hall 等 ^[58]	
耳乌贼目 Sepiolida	耳乌贼科 Sepiolidae	<i>Semirossia patagonica</i>	17 086	NC_016425	Kawashima 等 ^[56]	
枪形目 Teuthoidea	枪鱿科 Loliginidae	长枪鱿 <i>Loligo bleekeri</i>	17 211	AB029616	Tomita 等 ^[16] & Sasuga 等 ^[55]	
		莱氏拟乌贼 <i>Sepioteuthis lessoniana</i>	16 631	NC_007894	Akasaki 等 ^[8]	
		乳光枪鱿 <i>Doryteuthis opalescens</i>	17 387	NC_012840	Elliger 等*	
		大王鱿 <i>Architeuthis dux</i>	20 332	KC701763	Winkelann 等 ^[20]	
		深海鱿 <i>Bathyteuthis abyssicola</i>	20 075	AP012225	Kawashima 等 ^[56]	
		武装鱿科 Eupoloteuthidae	萤鱿 <i>Watasenia scintillans</i>	20 091	AB086202	Yokobori 等 ^[18]
		柔鱼科 Ommastrephidae	巴氏柔鱼 <i>Ommastrephes bartramii</i>	20 308	NC_020348	Wakabayashi 等*
			茎鱿 <i>Dosidicus gigas</i>	20 324	NC_009734	Elliger 等 ^[59]
			奥兰鸢鱿 <i>Sthenoteuthis oualaniensis</i>	20 306	NC_010636	Elliger 等 ^[59]
			太平洋褶鱿 <i>Todarodes pacificus</i>	20 247	AB240153	Akasaki 等 ^[8]
八腕目 Octopoda	蛸科 Octopodidae	短蛸 <i>Amphioctopus fangsiao</i>	15 979	AB240156	Akasaki 等 ^[8]	
		中国小孔蛸 <i>Cistopus chinensis</i>	15 706	KF017606	Cheng 等 ^[21]	
		台湾小孔蛸 <i>Cistopus taiwanicus</i>	15 793	NC_023257	Cheng 等 ^[21]	
		<i>Octopus conispadiceus</i>	16 027	KJ789854	Ma 等 ^[60]	
		长蛸 <i>Octopus minor</i>	15 974	HQ638215	Cheng 等 ^[15]	
		真蛸 <i>Octopus vulgaris</i>	15 744	AB158363	Yokobori 等 ^[18]	
幽灵蛸目 Vampyromopha	幽灵蛸科 Vampyroteuthidae	幽灵蛸 <i>Vampyroteuthis infernalis</i>	15 617	NC_009689	Yokobori 等 ^[17]	

注: * 表示仅有 GenBank 编号,文章尚未发表

Notes: * means the article has not published yet but the sequence has the GenBank number

Kawashima 等^[56]获得 6 种十腕目全序列,发现开眼亚目头足类具有 2 个较长的重复区,包括 *COI-III*、*ATP6*、*ATP8*、*tRNA-Asn* 以及 *ND2* 或 *ND3*,这是此类群 mtDNA 长于其他头足类的主要原因。虎斑乌贼 (*Sepia pharaonis*) *ATP6* 和 *ATP8* 不相邻,mtDNA 结构更似鸚鵡螺,系统树结果表明耳乌贼目和乌贼目为复系发生。Hall 等^[58]测得了微鳍乌贼科 *Idiosepius* sp. 的 mtDNA 全序列,基因的排列顺序和核苷酸序列比对结果均显示,其与耳乌贼目的 *Semirossia patagonica* 更为相近,二者共享长度为 8 kb 的保守区域(包括 9 个蛋白编码基因和 10 个 tRNA 基因),此外还有 3 个较短的保守区域,长度分别为 2.8 kb,2.6 kb 和 1.7 kb。这一结果有助于阐明微鳍乌贼目和耳乌贼目之间的亲缘关系。Winkelmann 等^[20]对采自世界范围的 43 个大王乌贼 (*Architeuthis*) 群体遗传学分析,全序列结果证实世界范围大王乌贼为同种 (*A. dux*),同时发现它们的核苷酸多态性低,造成这一结果的原因尚不清楚。

八腕目的系统学研究中,Cheng 等^[15]测得了长蛸全序列,长蛸的基因排列顺序类似真蛸和短蛸,但是系统树分析结果支持长蛸的进化地位更接近于丽蛸属。Cheng 等^[21]测得中国小孔蛸 (*Cistopus chinensis*) 和台湾小孔蛸 (*C. taiwanicus*) 的 mtDNA 全序列。依据 13 个蛋白编码基因信息和 4 种建树方法,对 3 目 24 种头足类进行了系统发育分析。结果表明,利用线粒体全序列研究头足类目间的系统发育关系是适合的。两种小孔蛸聚为一支,亲缘关系近,与形态分类结果一致。小孔蛸属与类蛸属、丽蛸属亲缘关系较远,而与蛸属更近。mtDNA 全序列分析结果确认幽灵蛸目 (*Vampyromorpha*) 的分类地位和系统发生关系同样具有重要意义,幽灵蛸 (*Vampyroteuthis infernalis*) 基因组结构与真蛸 (*Octopus vulgaris*) 相似,支持幽灵蛸目和八腕目具有较近的亲缘关系^[10]。

3 总结与展望

mtDNA 已被广泛应用于头足类近缘种属,科目等不同分类阶元的系统发生和分子进化等研究。由于 mtDNA 存在父系渗透 (numts)、核酸替换饱和^[61]以及基因侧向转移^[62],加之群选择不当,常会引起系统发生树长枝吸收效应,从而直

接影响分析结果^[63]。例如,Strugnell 等^[22]发现选择不同的 mtDNA 基因及分析方法,结果存在差异。因此,mtDNA 基因用于系统发育和分子进化等研究也有其适合的领域,不同物种和不同分类阶元应选择不同 mtDNA 标记。通常亲缘关系较远的物种,选取比较保守的基因 (12S 或 16S 等);亲缘关系较近的物种,则选取进化速率较快的序列 (*COI*)。在头足类的分子系统学研究中 12S、16S 及 *COI* 基因应用最广,并且结合线粒体其他基因或区域 (*COII*、*COIII*、*ND1* 及 *NCR*) 或核基因 (18S、*rhod*、*pax-6*、*ODH* 及血蓝蛋白基因^[64]) 等用于头足类动物的分子系统学研究将是必然选择。此外,分子标记正由单一 DNA 序列片段向多片段、由序列长度较短基因向序列长度较长基因的方向发展。由此可见,线粒体全基因组分析将成为头足类分子系统学研究的热点。同时,古生物学、解剖学、形态学以及生态学数据引入头足类分子系统学研究,尤其是化石研究^[65]将为头足类系统演化和物种分化提供关键性节点,必将推动全面而准确地推演头足纲动物进化历程和分化机制的研究。

参考文献:

- [1] Allcock A L, Lindgren A, Strugnell J M. The contribution of molecular data to our understanding of cephalopod evolution and systematics: A review [J]. *Journal of Natural History*, 2014, doi: 10.1080/00222933.
- [2] Lu C C, Zheng X D, Lin X Z. Diversity of Cephalopoda from the waters of the Chinese mainland and Taiwan [C]. *Proceeding of the 1st Mainland and Taiwan symposium of Marine Biodiversity Studies*. Beijing: Ocean Press, 2012: 76-87. [卢重成,郑小东,林祥志. 中国大陆及台湾海域头足类多样性研究. 第一届海峡两岸海洋生物多样性研讨会文集. 北京:海洋出版社,2012: 76-87.]
- [3] Chen X J, Liu J L, Xu Q H. Current status and prospects of identification methods of the cephalopod population [J]. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 2006, 15 (2): 228-233. [陈新军,刘金立,许强华. 头足类种群鉴定方法研究进展. 上海水产大学学报,2006,15(2):228-233.]
- [4] Ponder W F, Lindberg D R. *Phylogeny and evolution of the Mollusca* [M]. California: University of California Press, 2008: 162-164.

- [5] Roper C F E, Sweeney M J, Nauen C E. Cephalopods of the world: An annotated illustrated catalogue of species of interest to fisheries FAO species catalogue, vol. 3 [J]. FAO Fisheries Synopsis, 1984, 125:4.
- [6] Young R E, Vecchione M, Donovan D T. The evolution of coleoid cephalopods and their present biodiversity and ecology [J]. South African Journal of Marine Science, 1998, 20(1):393 - 420.
- [7] Boletzky S V. A brief outline of the classification of recent cephalopods [J]. Bulletin de la Société Zoologique de France, 1999, 124(3):271 - 278.
- [8] Akasaki T, Nikaido M, Tsuchiya K, *et al.* Extensive mitochondrial gene arrangements in coleoid Cephalopoda and their phylogenetic implications [J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2006, 38(3):648 - 658.
- [9] Allcock A L, Piertney S B. Evolutionary relationships of southern ocean Octopodidae (Cephalopoda: Octopoda) and a new diagnosis of pareledone [J]. Marine Biology, 2002, 140(1):129 - 135.
- [10] Boore J L. Animal mitochondrial genomes [J]. Nucleic Acids Reserch, 1999, 27(8):1767 - 1780.
- [11] Curole J P, Kocher T D. Mitogenomics digging deeper with complete mitochondrial genomes [J]. Trends in Ecology and Evolution, 1999, 14(10):394 - 398.
- [12] Hebert P D N, Cywinska A, Ball S L, *et al.* Biological identifications through DNA barcodes [J]. Proceedings of the Royal Society-Part B: Biological Sciences, 2003, 270(1512):313 - 321.
- [13] Moritz C, Brown W M. Tandem duplications in animal mitochondrial DNAs: Variation in incidence and gene content among lizards [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1987, 84(20):7183 - 7187.
- [14] Pan B P, Pu W J. Research progresses of mitochondrial genome's genetics and evolution [J]. Bulletin of Biology, 2005, 40(8):1 - 3. [潘宝平, 卜文俊. 线粒体基因组的遗传与进化研究进展. 生物学通报, 2005, 40(8):1 - 3.]
- [15] Cheng R, Zheng X, Lin X, *et al.* Determination of the complete mitochondrial DNA sequence of *Octopus minor* [J]. Molecular Biology Reports, 2012, 39(4):3461 - 3470.
- [16] Tomita K, Yokobori S, Oshima T, *et al.* The Cephalopod *Loligo bleekeri* mitochondrial genome: Multiplied noncoding regions and transposition of tRNA genes [J]. Molecular Evolution, 2002, 54(4):486 - 500.
- [17] Yokobori S, Lindsay D J, Yoshida M, *et al.* Mitochondrial genome structure and evolution in the living fossil vampire squid, *Vampyroteuthis infernalis*, and extant cephalopods [J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2007, 44(2):898 - 910.
- [18] Yokobori S, Fukuda N, Nakamura M, *et al.* Long-term conservation of six duplicated structural genes in cephalopod mitochondrial genomes [J]. Molecular Biology and Evolution, 2004, 21(11):2034 - 2046.
- [19] Yuan Y, Li Q, Yu H, *et al.* The complete mitochondrial genomes of six heterodont bivalves (Tellinoidea and Solenoidea): Variable gene arrangements and phylogenetic implications [J]. PLOS One, 2012, 7(2):e32353.
- [20] Winkelmann I, Campos P F, Strugnell J, *et al.* Mitochondrial genome diversity and population structure of the giant squid *Architeuthis*: Genetics sheds new light on one of the most enigmatic marine species [J]. Proceedings the Royal Society-Part B: Biological Sciences, 2013, 280(1759):20130273.
- [21] Cheng R B, Zheng X D, Ma Y Y, *et al.* The complete mitochondrial genomes of two octopods *Cistopus chinensis* and *Cistopus taiwanicus*: Revealing the phylogenetic position of *Cistopus* genus in octopoda order [J]. PLOS One, 2013, 8(12):e84216.
- [22] Strugnell J, Norman M, Jackson J, *et al.* Molecular phylogeny of coleoid cephalopods (Mollusca: Cephalopoda) using a multigene approach; the effect of data partitioning on resolving phylogenies in a Bayesian framework [J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2005, 37(2):426 - 441.
- [23] Strugnell J, Voight J R, Collins M A, *et al.* Molecular phylogenetic analysis of a known and a new hydrothermal vent octopod: Their relationships with the genus *Benthoctopus* (Cephalopoda: Octopodidae) [J]. Zootaxa, 2009, 2096:442 - 459.
- [24] Piertney S B, Hudelot C, Hochberg F G, *et al.* Phylogenetic relationships among cirrate octopods (Mollusca: Cephalopoda) resolved using mitochondrial 16S ribosomal DNA sequences [J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2003, 27(2):348 - 353.
- [25] Dai L, Zheng X, Kong L, *et al.* DNA barcoding analysis of Coleoidea (Mollusca: Cephalopoda) from

- Chinese waters [J]. *Molecular Ecology Resources*, 2012, 12(3):437–447.
- [26] Zheng X D, Lin X Z, Lu C C, *et al.* A new species of *Cistopus* (Gray, 1849) (Cephalopoda: Octopodidae) from the East and South China Seas and phylogenetic analysis based on the mitochondrial COI gene [J]. *Journal of Nature History*, 2012, 46(5–6):355–368.
- [27] Bonnaud L, Lu C C, Boucher-Rodoni R. Morphological character evolution and molecular trees in sepiids (Mollusca: Cephalopoda): Is the cuttlebone a robust phylogenetic marker [J]. *Biological Journal of the Linnean Society*, 2006, 89(1):139–150.
- [28] Guzik M T, Norman M D, Crozier R H. Molecular phylogeny of the benthic shallow-water octopuses (Cephalopoda: Octopodinae) [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2005, 37(1):235–248.
- [29] Espiñeira M, Vieites J M, Santaclara F J. Species authentication of octopus, cuttlefish, bobtail and bottle squids (Families Octopodidae, Sepiidae and Sepiolidae) by FINS methodology in seafoods [J]. *Food Chemistry*, 2010, 121(2):527–532.
- [30] Staaf D J, Ruiz-Cooley R I, Elliger C, *et al.* Ommastrephid squids *Sthenoteuthis oualaniensis* and *Dosidicus gigas* in the eastern Pacific show convergent biogeographic breaks but contrasting population structures [J]. *Marine Ecology Progress Series*, 2010, 418:165–178.
- [31] Yoshida M, Tsuneki D, Furuya H. Molecular phylogeny among East-Asian cuttlefishes using three mitochondrial genes. *Cephalopods present and past: New insights and fresh perspectives* [M]. Dordrecht: Springer, 2010:144–155.
- [32] Allcock A L, Barratt I, Eléaume M, *et al.* Cryptic speciation and the circum polarity debate: A case study on endemic Southern Ocean octopuses using the COI barcode of life [J]. *Deep Sea Research-Part II: Topical Studies in Oceanography*, 2011, 58:242–249.
- [33] Undheim E A B, Norman J A, Thoen H, *et al.* Genetic identification of southern ocean octopod samples using mtCOI [J]. *Comptes Rendus Biologies*, 2010, 333(5):395–404.
- [34] Amor M D, Norman M D, Cameron H E, *et al.* Allopatric speciation within a cryptic species complex of Australasian octopuses [J]. *PLOS One*, 2014, 9(6):e98982.
- [35] Sin Y W, Yau C, Chu K H. Morphological and genetic differentiation of two loliginid squids, *Uroteuthis (Photololigo) chinensis* and *Uroteuthis (Photololigo) edulis* (Cephalopoda: Loliginidae) in Asia [J]. *Experimental Marine Biology and Ecology*, 2009, 369(1):22–30.
- [36] Wang H, Lin L, Liu S F, *et al.* DNA Barcoding for Cephalopoda in classification and phylogeny [J]. *Fishery Sciences of China*, 2011, 18(2):245–255. [王鹤, 林琳, 柳淑芳, 等. 中国近海习见头足类 DNA 条形码及其分子系统进化 [J]. *中国水产科学*, 2011, 18(2):245–255.]
- [37] Braid H E, McBride P D, Bolstad K S R. Molecular phylogenetic analysis of the squid family Mastigoteuthidae (Mollusca, Cephalopoda) based on three mitochondrial genes [J]. *Hydrobiologia*, 2014, 725(1):145–164.
- [38] Anderson F E. Phylogeny and historical biogeography of the loliginid squids (Mollusca: Cephalopoda) based on mitochondrial DNA sequence data [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2000, 15(2):191–214.
- [39] Carlini D B, Kunkle L K, Vecchione M. A molecular systematic evaluation of the squid genus *Illex* (Cephalopoda: Ommastrephidae) in the North Atlantic Ocean and Mediterranean Sea [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2006, 41(2):496–502.
- [40] Carlini D B, Young R E, Vecchione M. A molecular phylogeny of the octopoda (Mollusca: Cephalopoda) evaluated in light of morphological evidence [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2001, 21(3):388–397.
- [41] Kaneko N, Kubodera T, Iguchi A. Taxonomic study of shallow-water octopuses (Cephalopoda: Octopodidae) in Japan and adjacent waters using mitochondrial genes with perspectives on Octopus DNA barcoding [J]. *Malacologia*, 2011, 54(1–2):97–108.
- [42] Sosa I D B, Beckenbach K, Hartwick B, *et al.* The molecular phylogeny of five eastern north Pacific octopus species [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 1995, 4(2):163–174.
- [43] Söller R, Warnke K, Saint-Paul U, *et al.* Sequence divergence of mitochondrial DNA indicates cryptic biodiversity in *Octopus vulgaris* and supports the taxonomic distinctiveness of *Octopus mimus*

- (Cephalopoda: Octopodidae) [J]. *Marine Biology*, 2000, 136(1): 29 – 35.
- [44] Warnke K, Söller R, Blohm D, *et al.* A new look at geographic and phylogenetic relationships within the species group surrounding *Octopus vulgaris* (Mollusca, Cephalopoda): Indications of very wide distribution from mitochondrial DNA sequences [J]. *Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 2004, 42(4): 306 – 312.
- [45] Guerra A, Roura A, Gonzalez A F, *et al.* Morphological and genetic evidence that *Octopus vulgaris* Cuvier, 1797 inhabits Amsterdam and Saint Paul Islands (southern Indian Ocean) [J]. *Marine Science*, 2010, 67(7): 1401 – 1407.
- [46] Bonnaud L, Boucher-Rodoni R, Monnerot M. Relationship of some coleoid cephalopods established by 3' end of the 16S rRNA and cytochrome oxidase III gene sequence comparison [J]. *American Malacological Bulletin*, 1996, 12: 87 – 90.
- [47] Bonnaud L, Boucher-Rodoni R, Monnerott M. Phylogeny of cephalopods inferred from mitochondrial DNA sequences [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 1997, 7(1): 44 – 54.
- [48] Zheng X D, Wang R C. Morphological study on radula of nine cephalopods in the coastal waters of China [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2002, 26(5): 417 – 421. [郑小东, 王如才. 中国沿海九种头足类齿舌的形态学 [J]. *水产学报*, 2002, 26(5): 417 – 421.]
- [49] Lindgren A R, Giribet G, Nishiguchi M K. A combined approach to the phylogeny of Cephalopoda (Mollusca) [J]. *Cladistics*, 2004, 20(5): 454 – 486.
- [50] Takumiya M, Kobayashi M, Tsuneki K, *et al.* Relationships among major species of Japanese coleoid cephalopods (Mollusca: Cephalopoda) using three mitochondrial DNA sequences [J]. *Zoological Science*, 2005, 22(2): 147 – 155.
- [51] Lindgren A R. Molecular inference of phylogenetic relationships among Decapodiformes (Mollusca: Cephalopoda) with special focus on the squid order Oegopsida [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2010, 56(1): 77 – 90.
- [52] Takemoto K, Michiaki Y. Complete nucleotide sequences of mitochondrial DNA of long-finned squid *Loligo edulis* [J]. *Fisheries Science*, 2012, 78(5): 1031 – 1039.
- [53] Lindgren A R, Pankey M S, Hochberg F G, *et al.* A multi-gene phylogeny of Cephalopoda supports convergent morphological evolution in association with multiple habitat shifts in the marine environment [J]. *BMC Evolution Biology*, 2012, 12(1): 129.
- [54] Danic-Tchaleu G, Heurtebise S, Morga B, *et al.* Complete mitochondrial DNA sequence of the European flat oyster *Ostrea edulis* confirms Ostreidae classification [J]. *BMC Research Notes*, 2011, 4(1): 400.
- [55] Sasuga J, Yokobori S I, Kaifu M, *et al.* Gene contents and organization of a mitochondrial DNA segment of the squid *Loligo bleekeri* [J]. *Molecular Evolution*, 1999, 48(6): 692 – 702.
- [56] Kawashima Y, Nishihara H, Akasaki T, *et al.* The complete mitochondrial genomes of deep-sea squid (*Bathyteuthis abyssicola*), bob-tail squid (*Semirossia patagonica*) and four giant cuttlefish (*Sepia apama*, *S. latimanus*, *S. lycidas* and *S. pharaonis*), and their application to the phylogenetic analysis of Decapodiformes [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2013, 69(3): 980 – 993.
- [57] Wang W, Guo B, Li J, *et al.* Complete mitochondrial genome of the spineless cuttlefish *Sepiella inermis* (Sepioidea, Sepiidae) [J]. *Mitochondrial DNA*, 2013, doi: 10.3109/19401736.2013.819498.
- [58] Hall N E, Hanzak J, Allcock A L, *et al.* The complete mitochondrial genome of the pygmy squid, *Idiosepius* (Cephalopoda: Decapodiformes): The first representative from the family Idiosepiidae [J]. *Mitochondria DNA*, 2014, doi: 10.3109/19401736.2013.865180.
- [59] Elliger C A, Lebaric Z N, Gilly W F. Ommastrephid squids *Sthenoteuthis oualaniensis* and *Dosidicus gigas* in the eastern Pacific show convergent biogeographic breaks but contrasting population structures [J]. *Marine Ecology Progress Series*, 2010(418): 165 – 178.
- [60] Ma Y Y, Zheng X, Cheng R, *et al.* The Complete Mitochondrial Genome of *Octopus conispadiceus* (Sasaki, 1917) (Cephalopoda: Octopodidae) [J]. *Mitochondrial DNA*, 2014, doi: 10.3109/19401736.2014.92886.
- [61] Maddison W. Reconstructing character evolution on polytomous cladograms [J]. *Cladistics*, 1989, 5(4): 365 – 377.
- [62] Woese C R, Kandler O, Wheelis M. Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains archaea, bacteria, and eucarya [J]. *Proceeding Nature Academic Science USA*, 1990, 8

- (12):4576 – 4579.
- [63] Stöger I, Schrödl M. Mitogenomics does not resolve deep molluscan relationships (yet?) [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2013, 69 (2): 376 – 392.
- [64] Warnke K M, Meyer A, Ebner B, *et al.* Assessing divergence time of Spirulida and Sepiida (Cephalopoda) based on hemocyanin sequences [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2011, 58 (2): 390 – 394.
- [65] Fuchs D, Ifrim C, Stinnesbeck W. A new palaeoctopus (Cephalopoda: Coleoidea) from the late cretaceous of vallecillo, north-eastern Mexico, and implications for the evolution of Octopoda [J]. *Palaeontology*, 2008, 51 (5): 1129 – 1139.

Application of mitochondrial DNA in phylogenetic analysis of Cephalopods

ZHENG Xiaodong^{1*}, MA Yuanyuan¹, CHENG Rubin²

(1. Fisheries College, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

2. College of Pharmaceutical Science, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

Abstract: Owing to lack of recombination, maternal inheritance, absence of introns and higher evolutionary rates, mitochondrial DNA (mtDNA) are extensively used for population genetics, species identification and phylogenetic relationships at various taxonomic levels. In recent studies, phylogenetic analysis based on mtDNA sequence data has been proved to enhance resolution and statistical confidence of inferred phylogenetic trees when compared with traditional taxonomic methods. Taxonomy and phylogeny of Cephalopoda, which is by far one the most important economic and diversity group of mollusks, have become the most intriguing field. Herein, we provided a brief introduction to the contents and the structures of mtDNA, and subsequently reviewed the progress of mtDNA applied in cephalopod molecular systematics, especially the complete genome. Additionally, the research tendency of molecular systematics of cephalopods was discussed.

Key words: Cephalopoda; mtDNA; phylogenetics; cytochrome C oxidase subunit I gene; cytochrome C oxidase subunit III gene; 12S rRNA gene; 16S rRNA gene

Corresponding author: ZHENG Xiaodong. E-mail: xdzheng@ouc.edu.cn