

# 臺灣及日本野生九孔粒線體細胞色素 *c* 氧化酶次單元基因序列變異及遺傳結構之分析

曾福生\* · 杜金蓮 · 朱惠真 · 謝立偉 · 林金榮

行政院農業委員會水產試驗所水產養殖組

## 摘要

以九孔 (*Haliotis diversicolor*) 的粒線體細胞色素 *c* 氧化酶次單元基因 (cytochrome *c* oxidase subunit I, COI) 之部分基因序列, 探討澎湖 (P) (20 個樣本) 與花蓮 (H) (11 個樣本) 2 個臺灣野生群體和大阪 (N) (20 個樣本)、福岡 (M) (18 個樣本)、靜岡 (JO) (46 個樣本) 及沖繩 (D) (38 個樣本) 等 4 個日本野生群體的遺傳變異。選殖之 COI 的部分基因序列為 835 ~ 838 個鹼基對 (base pairs, bp), 合計 153 個樣本進行軟體比對分析後, 存有 113 種單倍型 (haplotype), 其中臺灣野生群, P 有 19 型、H 有 11 型; 日本野生群, N 有 19 型、M 有 18 型、D 有 38 型、JO 有 33 型。2 個臺灣野生群體, P 及 H 的變異位點 (variable sites) 為 3.95% 及 4.78%, 低於日本的 N、M、JO 及 D 群 (分別為 6.71%、19.59%、11.69% 及 30.06%)。核苷酸多樣性 (nucleotide diversity,  $\theta_{\pi}$ ) 指數分別為 0.0051 (P)、0.0093 (N)、0.0101 (JO)、0.0123 (H)、0.0312 (M) 和 0.0816 (D)。分析結果顯示, 臺灣的群體遺傳變異明顯低於日本群體, 表示臺灣野生九孔的遺傳變異正處於下降狀態。

關鍵字：九孔、細胞色素 *c* 氧化酶、單倍型、核苷酸多樣性

## 前言

九孔 (*Haliotis diversicolor*) 屬於軟體動物門 (Mollusca)、腹足綱 (Gastropoda)、前鰓亞綱 (Prosobranchia)、原始腹足目 (Archaeogastropoda)、鮑科 (Haliotidae)、鮑屬 (*Haliotis*)。主要分布在西太平洋, 北從日本南部, 南到澳洲的沿岸海域 (胡和陶, 1995); 臺灣野生九孔的分布區域有新北市、宜蘭縣、花蓮縣、台東縣 (含綠島及蘭嶼)、屏東縣、澎湖縣及金門縣 (巫, 2003), 主要棲息於潮間帶低潮區至水深 20 公尺以淺區域。

臺灣的九孔養殖已經有 30 餘年的歷史, 最早係於海中以竹籠蓄養 (林, 1964), 自 1979 年人工繁殖成功後 (陳與楊, 1979), 種苗的供應充足, 漁民開始大量開鑿海邊潮間帶做為九孔養殖池, 結

果對臺灣東北角珍貴的岩岸資源以及生態環境造成相當大的衝擊。政府為因應解決, 除了強制拆除違法養殖池外, 同時並責成農委會水產試驗所研發新的養殖方法。水試所在各界殷切盼望下, 於 1985 年, 由台南分所成功開發「陸上池九孔單層養殖法」, 接著又研發改良為「陸上池深水立體式養殖法」(楊與丁, 1989), 也因此帶動九孔養殖事業的蓬勃發展。然而自 2002 年起, 臺灣各地的九孔繁殖場陸續發生幼苗及成貝大量死亡問題, 造成業者重大損失, 九孔養殖產業也因而大幅衰退。

曾等 (2008) 調查養殖與野生貝的遺傳變異, 發現養殖貝顯著低於野生貝, 甚至趨於一致, 很明顯的有基因偏離的現象。養殖業者表示, 養殖九孔成貝大量死亡發生時, 都有排卵、排精的現象。九孔經多年自交繁殖後, 使現有的九孔品系極易受到水溫變動的刺激, 使成貝大量排卵及排精, 池水惡變, 導致九孔大量死亡。而在臺灣夏季高水溫期, 常有颱風過境, 若颱風行進路徑由臺灣東岸花蓮以北通過或掃過臺灣東北部,

\*通訊作者 / 基隆市和一路 199 號, TEL: (02) 2462-3101  
轉 2807; FAX: (02) 2462-8138; E-mail: fstseng@mail.gov.tw

往往會造成東北角海域的海水在短時間內 (24 h 內) 水溫劇降 10 ~ 12°C，颱風過後水溫在隔天恢復常態 (未發表之海水水溫觀測紀錄)，此瞬間激烈的水溫變動會刺激九孔排卵排精，為造成九孔夏季大量死亡的主因。有鑑於此，水試所依研究結果建議九孔業者，使用養殖的雌貝配野生的雄貝來繁殖幼苗，以增加遺傳變異，除順利解決了九孔落苗的問題，也改善成貝大量排卵、排精的問題。在持續追蹤 2005 年產的一批約 3 mm 大小、約 450 萬粒的幼苗，歷經台東、花蓮養殖，之後又移至東北角等地區繁養殖，共 4 個世代的田間養殖結果都沒有上述的問題發生，證實這樣的方法有效，也促使較有規模的九孔養殖業者于 2008 年從日本進口野生九孔成貝在宜蘭、蘇澳進行大量的雜交育苗，經過 2009 及 2010 兩年的繁養殖，無論在幼苗培育或成貝的養殖，活成率大幅提升且能越冬，顯示利用養殖貝與野生貝雜交的方式是相當可行的。

因為雜交的方法有效，所以業者積極地從國外如日本及泰國引進野生九孔進行雜交，但因奠基者效應 (founder effect) 或遺傳漂變 (genetic drift)，容易造成後代群體之遺傳多樣性降低，影響原有種原的遺傳性狀。因此有必要對於這些已引進的九孔野生貝的遺傳結構進行了解，提供日後人為育種選育的參考。

## 材料與方法

### 一、樣本採集與引子設計

採集之樣本共 153 個，包括 2 組臺灣野生群體：澎湖 20 個 (P)、花蓮 11 個 (H) 和 4 組日本野生群體：大阪 A 20 個 (N)、福岡 B 18 個 (M)、靜岡 C 46 個 (JO) 及沖繩 D 38 個 (D)。

粒線體 COI 部分序列選殖部分，以 NCBI (National Center for Biotechnology Information) 資料庫取得的雜色鮑 *H. diversicolor* (accession number : AY319440) 及 *H. diversicolor supertexta* (accession number : AY31944.2) COI 基因部分序列作為 COI 序列的外群對照。COI 基因序列全長約 1,272 bp，所設計的引子對，一個在第 256 ~ 279 核苷酸 (nucleotides, nt) Forward : 5'-CTGGCTACTTCCACCATCCCTGAC-3'；另一 1,064 ~ 1,090 nt，

Reverse : 5'-GACGTAATGGAAATGGGCTACGACGTAG-3'，可擴增約 835 bp。

### 二、體基因組萃取

體基因組 DNA (gDNA) 從肌肉組織萃取，切取約 0.1 g 的肌肉組織均質後，再加 50  $\mu$ L proteinase K 和 Lysis buffer 混合均勻，置於 55 °C 下輕搖振盪 2 h 後，再移置 4 °C 冰箱內 5 min，加入等體積的 phenol/chloroform 均勻混合，於 4 °C 下離心 10 min，取上清液加入 6 倍體積無水酒精，靜置於 -70 °C 下 1 h 後，以 12,000 $\times$ g 4 °C 離心 30 min 除去上清液，再以 70% 酒精離心清洗沉澱物，於室溫下陰乾，陰乾後加入適量 TE buffer 溶解，放置於 -25 °C 冰箱保存。

### 三、聚合酶連鎖反應

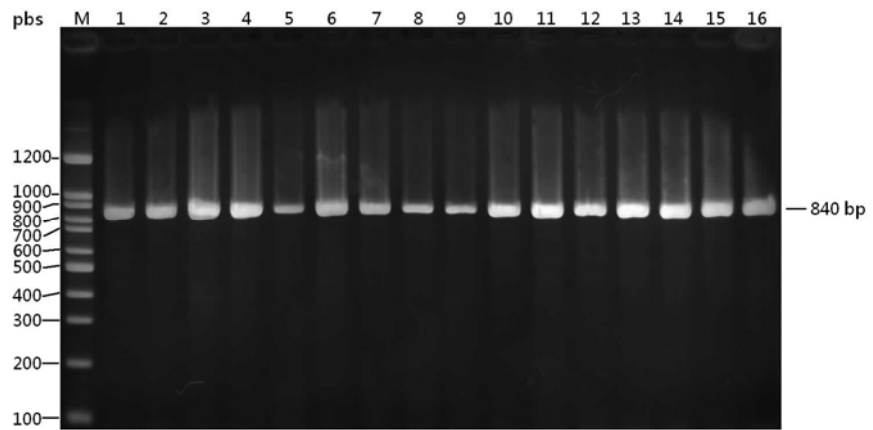
聚合酶連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction, PCR)，反應總體積 25  $\mu$ L，取九孔體基因組 DNA 60 ng、COI 基因引子對 0.1  $\mu$ M dNTP 200 mM 及 Taq 0.5U。PCR 反應條件：預熱 94 °C，5 min，執行 30 個循環，每個循環中包括：變性 (denaturing) 94 °C，60 sec；煉合 (annealing) 53 °C，90 sec；延展 (extension) 72 °C，180 sec，結束後以 72 °C，10 min 使 PCR 作用完全。

### 四、電泳分析及標的基因選殖

取 5  $\mu$ L PCR 產物和 1  $\mu$ L 10X loading buffer 混合均勻，以 1.5% 瓊脂膠 (GIBCO) 在電壓 100 伏特下，進行水平式電泳 30 min，以 100 bp ladder 為標記，以溴化乙啶染色後，在紫外燈箱檢視 PCR 產物。

將預期大小的分子量條帶切下，以 QIAGEN QIAquick<sup>®</sup> Gel Extraction Kit 回收，並以 yT&A cloning Vector Kit 進行選殖。挑選菌落委由明欣生物科技有限公司 (Mission Biotech Co. Ltd., Taipei, Taiwan) 採用自動定序儀 (ABI PRISM<sup>™</sup> 3730 XL DNA Analyzer, Applied Biosystems, California, USA)，以 T 載體上的引子 M13 forward 與 reverse 來進行序列定序。

**Fig. 1** PCR products from genome of small abalone, *H. diversicolor*, used a pair of primers designed from COI gene and separated in an agarose gel. Lane M: weight marker; 1 ~ 3: O (Shizuoka); 4 ~ 6: D (Okinawa); 7 ~ 9: N (Osaka); 10 ~ 12: M (Fukuoka); 13,14: H (Hualien); 15, 16: P (Penghu).



**Table 1** Base composition of partial COI gene sequence of 6 populations of small abalone, *Haliotis diversicolor*

	Base composition%					
	A	G	C	T	G+C	A+T
P	27.0	17.5	26.2	29.2	43.7	56.3
N	26.9	17.6	26.2	29.3	43.8	56.2
M	27.2	17.8	25.7	29.3	43.5	56.5
H	27.1	17.6	26.1	29.2	43.7	56.3
D	27.0	17.5	26.1	29.5	43.6	56.4
JO	27.0	17.6	26.2	29.2	43.8	56.2

## 結 果

### 五、鄰聚法 (neighbor-joining method, NJ) 樹狀圖建構

將定序成功之樣本 COI 序列資料匯入軟體 MEGA (Kumar *et al.*, 2008), 以其中的 ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) 方法進行排序 (alignment) 及整理, 結果再利用肉眼進行檢視以及人工校正後, 以鄰聚法繪製 COI 序列的樹狀圖。

### 六、遺傳多樣性及遺傳結構分析

將經由 MEGA 軟體中的 ClustalW 排序及整理後之 COI 序列資料匯入軟體 DnaSP 5.1 (Librado and Rozas, 2009) 分析各族群的單倍型 (haplotype) 數量及在族群間的分布、單倍型多樣性 (haplotype diversity, *h*) (Nei and Tajima, 1983) 與核苷酸多樣性 (Nei, 1987)。

### 一、PCR 擴增、序列測定及排序

六個不同來源九孔群體 COI 之 PCR 擴增部分片段大小約為 840 bp (Fig. 1)。經 PCR 條件最佳化的調整後, 擴增 6 個不同來源九孔群體, 共 160 個樣本的 PCR 產物純化後定序, 其中 153 個樣本定序成功、7 個樣本定序後沒有結果。定序成功的 153 個擴增片段 (包括引子部分及部分端點序列), 經同源重排後的長度為 835 ~ 838 bp。

### 二、不同來源的九孔群體粒線體 COI DNA 序列的鹼基組成

在序列中 A、G、C 及 T 等 4 種鹼基的組成分別為 26.9 ~ 27.2%、17.5 ~ 17.8%、25.7 ~ 26.2% 及 29.2 ~ 29.5%, A+T 含量 56.2 ~ 56.5% 高於 G+C 的 43.5 ~ 43.8% (Table 1), A 和 T 含量較為接近。部分 COI 基因的同源序列透過 Mega 5.0 軟

**Table 2** Number of variable sites and the transition bias of partial COI gene sequence of 6 populations of small abalone, *Haliotis diversicolor*

	P	N	M	H	D	JO	total
Transition	3.0	7.0	12.0	9.0	47.0	7.0	39
Transversion	1.0	1.0	14.0	2.0	20.0	2.0	24
Transition bias	3.25	5.48	0.90	3.50	2.31	3.93	1.63

**Table 3** Polymorphism, haplotype diversity (Hd), nucleotide sequence diversity and average genetic distance of partial COI gene sequence of 6 populations of small abalone, *Haliotis diversicolor*

	P	N	M	H	D	JO	Total
Number of sites	835	835	837	836	835	838	838
Variable sites*	33	56	164	40	251	98	407
Polymorphism (%)	3.95	6.71	19.59	4.78	30.06	11.69	48.57
Samples(n)	20	20	18	11	38	46	153
Haplotype (n)	19	19	18	11	38	33	113
Haplotype diversity	0.9947	0.9947	1.000	1.000	1.000	0.9874	0.9955
Nucleotide diversity	0.0051	0.0093	0.0312	0.0123	0.0816	0.0101	0.0780
Average genetic distance	0.0027	0.0047	0.0177	0.0066	0.0513	0.0051	-

\*Excluding sites with gaps/missing data

體分析，在 6 個九孔群體 P、N、M、H、D 及 JO，除了 M 群外，其中轉換數 (transition) 均大於顛換數 (transversion)，M 群之轉換偏差率 (transition bias) 為 0.90，其餘各群介於 2.31 ~ 5.48 之間，如 Table 2。

### 三、不同來源的九孔群體粒線體 COI DNA 序列的變異位點及多態性分析

在 6 組九孔群體之部分 COI 基因的同源序列變異位點 (variable sites) 分析結果，P、N、M、H、D 及 JO 分別有 33、56、164、40、251 及 98 個變異點，如 Table 3。臺灣群體 P 和 H 位於臺灣兩側，不同地理群體的部分 COI 基因同源序列變異位點數卻相當相近 (33 和 40)，顯著小於日本群體，而於日本群體中 M、D 及 JO 等三群，變異位點數高達 164、251 及 98，遠高於 N 群的 56；另於 P、N、M、H、D 及 JO 之多態性 (polymorphism) 分析，依序為 3.95%、6.71%、19.59%、4.78%、30.06% 及 11.69%，臺灣的野生群體 P 及 H 之多態性，很明顯低於日本的野生

群體 N、M、D 及 JO。

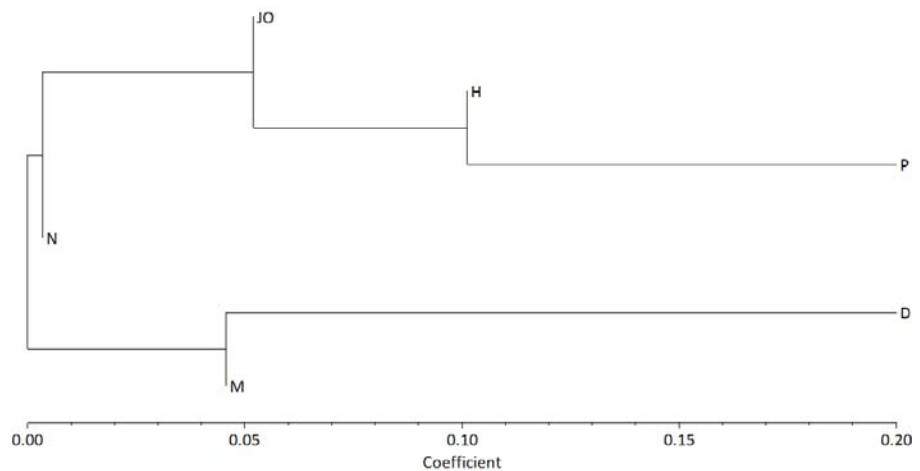
### 四、不同來源的九孔群體遺傳結構

不同來源的九孔群體在 153 個樣本中，其粒線體 DNA 序列中 COI 的單倍型多樣性共有 113 種單倍型，單倍型頻率為 73.86% (113/153)，單倍型多樣性 (haplotype diversity) 為 0.9955，各群體：P、N、M、H、D 及 JO 的單倍型及多樣性如 Table 3，顯示這些九孔群體的單倍型種類變異大。

核苷酸多樣性以 P 群最低，臺灣的野生群相對的低於日本，但日本野生群 D 的各項指數都大於其他 5 個群體。變異位點的多態性比例如 Table 3、核苷酸多樣性的差異結果，臺灣的野生群相對的低於日本，顯示臺灣的野生群有純化趨勢，尤其是 P 群。

對於不同來源的九孔群體 COI 序列差異的遺傳距離如 Table 4。從表中除了日本野生群 D，其他 5 個群體中，可以看出臺灣的兩個群體和日本的 JO 群體遺傳距離分別為 P 與 JO 為 0.005，H 與

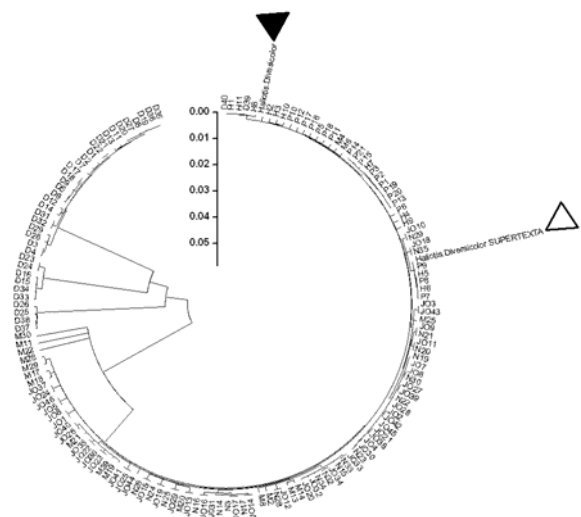
**Fig. 2** Phylogenetic trees of COI partial sequence constructed by Neighbor joining method for 6 populations of small abalone, *Haliotis diversicolor*.



**Table 4** Average genetic distance of partial COI gene sequence between 6 populations of small abalone, *Haliotis diversicolor*

	JO	D	H	M	N	P
JO						
D	0.111					
H	0.007	0.111				
M	0.012	0.116	0.013			
N	0.005	0.111	0.007	0.012		
P	0.005	0.110	0.005	0.110	0.005	

JO 為 0.007 相當近；而 D 與其他 5 個群體的遺傳距離均超過 0.110 以上。在 6 個不同來源的九孔群體，各自群體的 COI 序列的平均遺傳距離經 MEGA 5 軟體計算如 Table 3 所示，P、N、M、H、D 及 JO 分別為 0.0027、0.0047、0.0177、0.0066、0.0513 及 0.0051，P 群體遺傳距離最低，為相當純化的群體。各群體間鄰聚法樹狀圖，如 Fig. 2，以各群體的群內平均遺傳距離劃分，可將 6 個群體分為兩大群，一大群由 P、N、H 及 JO 等 4 個群體組成，其中臺灣的兩個群體 P 及 H 先歸群，再與日本的群體 JO 歸群，最後和 N 群體歸成一類；另一大群為 M 及 D 組成。再從個體的鄰聚分析的樹狀圖，如 Fig. 3，153 個體中 D 群是獨立的一群，除 D40 外和其他 5 個群體 (P、N、M、H 及 JO) 與兩個來自 NCBI 對照的 *H. diversicolor* 和 *H. diversicolor supertexta* 變異大，顯示 P、N、M、H、JO 與 *H. diversicolor* 和 *H. diversicolor supertexta* 相近，除了 M4、M11 及 M30 外，其距離在 0.01 以內，其中臺灣的兩個野生群 P 及 H 和兩個來自 NCBI 對照九孔的遺傳距離較相近。



**Fig. 3** Phylogenetic trees of COI partial sequence constructed by Neighbor joining method for 153 small abalones, *Haliotis diversicolor* and two control individuals *Haliotis diversicolor* (▲) and *Haliotis diversicolor supertexta* (△) from NCBI.

## 討 論

引種進行系統雜交是農業生產中有效的育種

方法之一，因此業者引進國外野生九孔與臺灣的養殖九孔雜交，2007 年底首批雜交幼苗在新北市東北角大規模養殖，結果發現原臺灣繁殖九孔是無法過冬，但雜交貝可以過冬繼續成長；這樣的結果讓業者急於從日本引進野生九孔，也造成連續幾年來東北角養殖雜交貝及其自交或再回交臺灣貝的後代，成長及存活率等養殖效果參差，尤其是雜交貝之存活率顯著優於臺灣養殖貝自交的後代，此現象是在夏季的颱風過境後及秋冬季節更為突出。臺灣貝的繁殖及成長性狀均遠優於日本野生貝，日本野生貝對雜交後代的存活率則有相當的貢獻，但其雜交後代繁殖及成長性狀變異大，主要是這些引種及其後代都在人為的操作下，參與繁殖的親本數量太少，尤其是這些不同來源的野生九孔遺傳結構不明情況下，極容易造成奠基者效應或遺傳漂變，進而造成後代群體遺傳多樣性降低，因此，近親繁殖，需要有效管理。粒線體的單倍型多樣性和核苷酸多樣性，為評估遺傳多樣性指標中的幾個重要項目，本研究以 mtDNA COI 部分序列比較 6 個不同來源九孔群體，P、N、M、H、D 及 JO，PCR 擴增的片段大小在 835 ~ 838 bp 之間，這些都是經雙向定序，有長度上的差異存在，序列中 4 種鹼基的組成沒有差異，而這些鹼基轉換和顛換現象，臺灣的 2 個 (P, H) 野生群來自澎湖和花蓮，轉換數為 3 和 9，顛換數為 1 和 2，明顯少於日本野生群體轉換數 7、7、12 和 47，顛換數 1、2、14 和 20，其中 M 和 D 兩群遠高於其他群體，可能這些群體是採自日本不同地區的集合體，其中 M 群轉換偏差率小於 1，這是少有的現象 (Brown *et al.*, 1982; Gojobori *et al.*, 1982; Curtis and Clegg 1984; Wakeley 1994, 1996; Yang and Yoder 1999)，異於其他的 5 個群體。

在不同來源的九孔群體之粒線體 DNA 序列中 COI 的單倍型多樣性比對結果顯示，各群體介於 0.9874 ~ 1.000 之間，多樣性高。P、N、M、H、D 及 JO 之核苷酸多樣性依序為：0.00509、0.00932、0.03115、0.01233、0.08160 及 0.01007，其中無論是單倍型多樣性或核苷酸多樣性，P 群均呈現較低的數值，臺灣的野生群各項指數相對的都低於日本，多樣性位點比例、變異位點的差異結果都顯示臺灣的野生群有純化趨勢。但在核

苷酸多樣性臺灣的 H 群體並不低，其雜交後代在現場養殖的效果並不比來自大阪及靜岡的雜交後代差。

Grant and Bowen (1998) 將核苷酸多樣性與單倍型多樣性的組合變異分成四種型態，評估族群歷程，第 1 型：當單倍型多樣性與核苷酸多樣性的變異都低，代表曾發生瓶頸效應或是由單一或少數個體所產生的奠基者效應；第 2 型：當單倍型多樣性的變異大與核苷酸多樣性的變異低，代表經歷低有效族群量後又伴隨著迅速的族群成長與突變的累積；第 3 型：當單倍型多樣性的變異低與核苷酸多樣性的變異高時，這可能是來自於兩個分歧的族群中極少數的有效族群發生二次接觸 (secondary contact) 所導致，或者是在一個大而且穩定的族群中發生了瓶頸效應所產生；第 4 型：單倍型多樣性與核苷酸多樣性的變異均高時，表示是一個大而穩定的族群在經過長時間的演化所產生的，或者是兩個分歧之異域族群二次接觸後形成。臺灣的野生群在 COI 序列的分析結果是臺灣野生群 P 屬於第 2 型，顯示 P 群可能是經歷低有效族群量 (effective population size) 後，伴隨著迅速的族群成長與部份突變的累積而構成現在的族群遺傳多樣性，臺灣的菊池氏細鯽 (*Aphyocypris kikuchii*) 就有這樣的現象 (Lin *et al.*, 2008)。日本野生群 D，和臺灣野生群 H 同屬於第 4 型，是一個大而穩定的族群在經過長時間的演化所產生的，或者是兩個分歧之異域族群接觸後形成，因 D 群來自沖繩，地理上介於臺灣與日本之間，有可能這兩個地理群會有接觸可能。

從 COI 的樹狀圖來看，所有的樹型皆呈現出臺灣野生群 P 和 H 與日本野生群 N 及 JO 相近 (Fig. 2 和 Fig. 3)，並且其間之遺傳距離差異僅有 0.005 ~ 0.007 (Table 4)，而臺灣野生群 P 和 H 與日本野生群 D 之間的遺傳距離卻高達 0.110 與 0.111。日本野生群 D 與日本另外三個野生群 N、M 及 JO 遺傳距離也高達 0.111 ~ 0.116，顯示 D 群與臺灣和日本兩地的 5 個野生群是有隔離的，然而臺灣的兩個野生群 P 及 H 分別在臺灣西部的澎湖和東部的花蓮卻看不出有隔離的情況，由 Grant and Bowen 核苷酸多樣性與單倍型多樣性的變異組合評估族群歷程，臺灣野生群 P 屬第 2 類型：當單倍型多樣性的變異大與核苷酸

多樣性的變異低，表示經歷低有效族群量後又伴隨著迅速的族群成長與突變的累積，以軟體 Network 分析 P 群和 H 群系出同源，因此臺灣野生群 P 可能源自花蓮的野生群 H。

COI 樹狀圖中，臺灣野生群 P 和 H 與日本野生群 N、M 及 JO 混雜無法區隔，且與來自 NCBI 對照的 *H. diversicolor* 和 *H. diversicolor supertexta* 同群 (Fig. 2)。N、M 及 JO 群目前都與臺灣的養殖貝都有雜交的後代，由 COI 樹狀圖可判斷出，M 群的雜交後代已繁衍了 5 代，是最多代的，而 D 群與臺灣群體尚無雜交的子代。

本研究中的日本野生群 N、M、D 及 JO 等 4 群，N、M、D 等 3 群由業者引進，JO 群由國立臺灣海洋大學引進，本研究可以初步判定臺灣群的 P 和 H 與日本群的 N 和 JO 相近，與 M 群距離較遠，與 D 群最遠。在這些與臺灣養殖貝雜交後代，東北角養殖效果存活率都高於臺灣自交貝後代，其中以 JO 群雜交最好；成長效果則以 M 群雜交最佳，JO 群較差。因此，未來首先需先對這群體在臺灣地區繁衍後代的適應、遺傳變異及結構，加以詳細檢視作為未來引種的參考。

## 參考文獻

- 巫文隆 (2003) 臺灣貝類目錄 I: 腹足綱-原始腹足目。行政院農業委員會出版，中央研究院編印，20 pp.
- 林書荻 (1964) 九孔之蓄養調查及低溫乾燥試驗。中國水產, 138: 13-16.
- 胡忠恆, 陶錫珍 (1995) 臺灣現生貝類彩色圖鑑。國立自然科學博物館, 38 pp.
- 陳弘成, 楊鴻禧 (1979) 九孔 (*Haliotis diversicolor supertexta*) 之人工繁殖。中國水產, 314: 3-9.
- 曾福生, 周賢鏘, 朱惠真, 余俊欣, 盧民益, 林金榮 (2008) 利用 RAPD 分析台灣東部養殖及野生九孔的遺傳變異。水產研究, 16 (2): 49-58.
- 楊鴻禧, 丁雲源 (1989). 九孔陸上多層式養殖方法之研究。臺灣省水產試驗所試驗報告, 48: 209-216.
- Bandelt, H. J., P. Forster and A. Rohl (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. Mol. Biol. Evol., 16 (1): 37-48.
- Brown, W. M., E. M. Prager, A. Wang and A. C. Wilson (1982) Mitochondrial DNA sequences of primates, tempo and mode of evolution. J. Mol. Evol., 18: 225-239.
- Curtis, S. E. and M. T. Clegg (1984) Molecular evolution of chloroplast DNA sequences. Mol. Biol. Evol., 1: 291-301.
- Gojobori, T., W. H. Li and D. Graur (1982) Patterns of nucleotide substitution in pseudogenes and functional genes. J. Mol. Evol., 18: 360-369.
- Grant, W and B. W. Bowen (1998) Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. J. Hered., 89: 415-426.
- Kumar, S., J. Dudley, M. Nei and K. Tamura (2008) MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. Brie. Bioinform., 9: 299-306.
- Librado, P. and J. Rozas (2009) DnaSP V5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. Bioinformatics, 25 (11): 1451-1452.
- Lin, H. D., K. C. Hsu, K. T. Shao, Y. C. Chang, J. P. Wang, C. J. Lin and T. Y. Chiang (2008) Population structure and phylogeography of *Aphycocypris kikuchii* (Oshima) based on mitochondrial DNA variation. J. Fish Biol., 72: 2011-2025.
- Nei, M (1987) Molecular Evolutionary Genetics. New York, Columbia University Press.
- Nei, M. and F. Tajima (1983) Maximum likelihood estimation of the number nucleotide substitutions from restriction sites data. Genetics, 105 (1): 207-217.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins and T. J. Gibson (1994) Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res., 22: 4673-4680.
- Wakeley, J. (1994) Substitution rate variation among sites and the estimation of transition bias. Mol. Biol. Evol., 11: 436-442.
- Wakeley, J. (1996) The excess of transitions among nucleotide substitutions: New methods of estimating transition bias underscore its significance. TREE 11: 158-163.
- Yang, Z. and A. D. Yoder (1999) Estimation of the transition / transversion rate bias and species sampling. J. Mol. Evol., 48: 274-283.

## Genetic Variation and Phylogenetic Analysis of Mitochondrial Cytochrome *c* Oxidase Subunit I (COI) in Wild-type Small Abalones from Taiwan and Japan

Fu-Shen Tseng<sup>\*</sup>, Jin-Lien Du, Huei-Jen Chu, Li-Wei Hsieh and King-Jung Lin

Aquaculture Division, Fisheries Research Institute

### ABSTRACT

The mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit I gene (COI) was partially sequenced in specimens of the wild-type small abalone, *Haliotis diversicolor*, from Taiwan and Japan. There were a total of six wild-type populations with 153 individuals. Two populations from Taiwan, including 20 P (Penghu) and 11 H (Hualien), and 4 populations from Japan, including 20 N (Osaka), 18 M (Fukuoka), 38 D (Okinawa) and 46 JO (Shizuoka), were analyzed. The partial DNA sequence analysis from 835~838 base pairs of the COI gene identified the following 113 haplotypes: 19 (P) and 11 (H) haplotypes from Taiwan and 19 (N), 18 (M), 38 (D) and 33 (JO) from Japan. The variable sites of the two Taiwanese populations (3.95% in P and 4.78% in H) were lower than the four Japanese populations (6.71% in N, 19.59% in M, 11.69% in JO and 30.06% in D). The nucleotide diversity indexes ( $\theta_\pi$ ) were 0.0051 (P) and 0.0093 (N) from the Taiwanese populations and 0.0101 (JO), 0.0123 (H), 0.0312 (M) and 0.0816 (D) from the Japanese populations. The haplotype analysis showed that the wild-type small abalone population in Taiwan was significantly lower than the wild-type small abalone population in Japan, suggesting a decrease in the genetic variation of the Taiwanese wild-type population.

**Key words:** *Haliotis diversicolor*, cytochrome *c* oxidase, haplotype, nucleotide diversity ( $\theta_\pi$ )

---

\*Correspondence: Aquaculture Division, Fisheries Research Institute, 199 Hou-lh Rd, Keelung 202, Taiwan. (02)2463-3101; FAX: (02)2462-8138; E-mail: fstseng@mail.tfrin.gov.tw