

中国沿海六个地理群体短蛸的遗传变异研究

吕振明¹, 李焕¹, 吴常文¹, 樊甄姣¹, 张建设¹

(1. 浙江海洋学院 浙江省海洋养殖装备与工程技术重点实验室, 浙江 舟山 316000)

摘要: 采用线粒体 COI 基因测序技术分析了中国沿海重要经济头足类短蛸(*Octopus ocellatus*) 6 个地理群体的遗传结构及其变异, 结果表明我国短蛸资源的遗传多样性相对丰富, 在 654 bp 长度的核苷酸片段中共检测到 42 个多态位点, 多态位点比例达 6.42%, 检测的 60 个个体中共获 23 个单倍型, 单倍型多样性指数为 0.200~0.867, 平均核苷酸多样性指数为 0.0003~0.0097, 平均核苷酸差异数为 0.200~6.311, 高于多数海洋头足类的遗传变异。对 6 个群体的遗传结构进行检测表明, 我国的短蛸群体间除部分群体外均存在显著的遗传分化($P < 0.05$), 遗传结构基本符合脚踏石模型。聚类分析表明 6 群体已明显分化为两个类群, 一个由大连、青岛、连云港群体组成, 另一个由舟山、上海和广州群体组成, 两类群间存在 20 个固定位点核苷酸差异, 编码的蛋白质存在 2 个固定氨基酸残基的差异。两类群的分化系数达 0.8602 ($P < 0.01$), 基因流大大小于 1; AMOVA 检测显示仅有 12.72% 的遗传差异存在于群体内部, 而 87.28% 的遗传差异存在于群体间。短蛸遗传变异的研究成果可为今后我国短蛸资源更好的开发和管理提供理论基础。

关键词: 地理群体; 短蛸; 遗传变异

中图分类号: Q151; Q959.216+.1

文献标志码: A

文章编号: 0253-4193(2010)01-0130-09

1 引言

种群遗传变异研究是当前海洋生物学研究的热点^[1]。遗传变异研究不仅可以为海洋生物种群结构、区系分布、环境适应状况等基础生物学的了解提供基本信息^[2-4], 而且还可以为海洋生物资源的开发、管理提供指导^[5]。近年来随着国际传统海洋生物资源的普遍衰退, 新型海洋生物资源的开发与传统海洋生物资源的保护和管理已成为本世纪的双重挑战, 海洋生物遗传变异及多样性的研究再一次引起国际社会的广泛关注, 以形态、染色体、蛋白质及 DNA 为基础的种群遗传变异研究在海洋鱼类、贝类、藻类及虾蟹类^[6]中已广泛开展。

海洋头足类是世界重要的海洋生物资源, 也是至今仍尚未充分开发的少数几种渔业资源之

一^[7]。近几年来随着国际海洋头足类研究和开发的兴起, 海洋头足类种群遗传学和群体遗传变异的研究也逐渐在世界范围内开展, 至今为止已在乌贼^[8-9]、章鱼^[10-11]、鱿鱼^[12-13]及鹦鹉螺^[14]等主要头足类种类中得到广泛研究, 这些工作为正进行的国际海洋头足类资源的开发和管理奠定了良好的基础, 但长期的研究表明, 头足类是一类遗传变异相对贫乏的海洋生物类群^[15], 极低的遗传多样性和高度的遗传均质性已在众多海洋头足类中得以验证, 有人甚至将此归因于海洋头足类特殊的历史瓶颈及现实的种群增长^[15-16]。近年来随着研究的不断深入, 特别是高新技术手段在海洋头足类遗传变异中的广泛运用, 丰富的遗传变异和复杂的种群遗传结构已逐渐在海洋头足类种群中陆续得以证实^[17-18], 隐种或亚种现象已在乌贼、章

收稿日期: 2009-04-08; 修订日期: 2009-10-24。

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2007BAD43B00); 浙江省高等学校优秀青年教师资助计划项目。

作者简介: 吕振明(1976—), 男, 浙江省长兴市人, 副教授, 博士, 主要从事海洋生物遗传育种研究。E-mail: nblzmn@163.com

鱼、鱿鱼等多种海洋头足类中陆续被发现^[17-18]。这些研究进一步表明,要实现海洋头足类资源的高效开发和有效管理必须对其种群结构和遗传变异作更深入的研究。

短蛸(*Octopus ocellatus*)是我国沿海重要的海洋头足类,又名饭蛸、坐蛸、短腿蛸,属软体动物门(Mollusca)头足纲(Cephalopoda)蛸科(Octopodidae)蛸属动物,广泛分布于黄海、渤海、东海和南海海域^[19]。因其肉味鲜美,营养丰富,深受消费者喜爱,产品远销国内外市场。近年来随着我国海洋头足类资源开发的蓬勃发展,我国短蛸资源也得到了广泛开发,据统计我国沿海仅山东省年产量就有数百吨,在东海区和南海区也有相当的产量,在我国海洋头足类总产量中占有相当的比重^[19]。短蛸资源的开发客观上要求对其种群结构和遗传变异有深入的了解,但近年来有关我国短蛸种群结构和遗传变异的研究还少有报道,仅见高强等^[20]采用同工酶技术对黄海、渤海海域 5 个短蛸群体进行了研究,而在更大尺度上采用 DNA 标记对其遗传变异进行深入研究还未有人涉及,这大大影响对该资源长期有效开发和管理。

本文拟采用线粒体基因测序技术对黄海、渤海、东海、南海 6 个地理群体短蛸资源的遗传变异和种群结构进行研究,希望从线粒体 DNA 入手,检测我国短蛸群体中用常规形态学无法反映的微细遗传差异和遗传结构,从而为我国短蛸资源更合理的开发和管理提供信息基础,也为今后我国短蛸资源的人工开发和保护提供理论指导。

2 材料和方法

2.1 材料

短蛸取自黄海、渤海、东海和南海海域,采集地点分别为辽宁省大连、山东省青岛、江苏省连云港、浙江省舟山、上海、广东省广州,对于各海域取短蛸样本 10 尾,样本解剖后取新鲜肌肉样品放入 70% 酒精固定液中保存,带回实验室备用。

2.2 方法

2.2.1 DNA 的提取

DNA 提取参考《分子克隆实验指南》^[21],采用常规酚-氯仿方法进行,在 DNA 样品中加 60 μL 双蒸水溶解,置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

2.2.2 COI 基因扩增和测序

COI 序列的扩增参照 Lin 等^[22]的方法进行,稍

加改进。具体方法为:扩增引物 DL-S, 5'-TA-AACTTGAGGGTGACCAAAAAAT-3'; DL-R, 5'-GGTCAACAAATCATA AAGATAT TG-3'; 序列扩增采用 50 μL 反应体系,其中含模板 DNA 50 ng, 含 1x 缓冲液, 2.0 mmol/dm³ MgCl₂ 取 0.2 mmol/dm³ 每种 dNTPs 含 0.2 $\mu\text{mol/dm}^3$ 每个引种,及 4U Taq 酶。PCR 反应程序:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min 后,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min,51 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min,共 40 个循环,最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。所得 PCR 产物在 1.5% 琼脂糖凝胶上进行电泳检测,凝胶成像系统拍照观察。扩增产物采用上海 Watson 公司的 Gel Extraction mini kit 试剂盒进行纯化,并送往上海 Invitrogen 公司进行测序。

2.2.3 数据分析

所得序列采用 Clustal w1.83 软件进行编辑、校对和排序,采用 DNAsp4.10 软件对多态位点数、单倍型数、转换与颠换数、核苷酸多样性、单倍型多样性、平均核苷酸差异数等遗传多样性参数进行计算;采用 Mega 3.1 软件进行遗传距离计算和聚类分析,系统树采用 UPGMA 模型进行构建,并采用 bootstrap(重复次数为 1000)检验聚类树各分支置信度;此外,用 Arlequin3.01 软件估算遗传变异在群体内和群体间的分布(AMOVA 法),并计算群体间遗传分化系数 F_{st} 及显著性(重复次数为 1 000),群体间基因流 Nm 由公式 $Nm = (1 - F_{st}) / 2F_{st}$ 计算而得。采用 Tajima 的 D 检验和 Fu 的 FS 检验来检测中性假说是否成立,Tajima 的 D 和 Fu 的 FS 中性检验结果如为负值并且显著偏离中性,则可能是由于群体扩张引起的^[5]。

3 结果

3.1 短蛸群体 COI 基因的序列组成和变异信息

对 6 个短蛸群体共 60 个个体的 COI 序列进行测定,经 clustal w1.83 软件编辑和比对后,获得了长度为 654 bp 的同源序列,经 Mega 3.1 软件分析,该序列的 T, C, A, G 碱基含量分别为 37.6%, 18.4%, 28.7% 和 15.3%。A+T(66.3%) 大大高于 G+C(33.7%) 含量,符合一般头足类 COI 基因的序列特点,DNAsp4.10 软件分析显示,从 60 个个体共检测到 42 个变异位点,占分析位点总数的 6.42%,其中单突变位点(singleton variable sites)为 10 个,简约信息位点(parsimony informative sites)为 32 个;变异位点中发生转换的位点为 26 个,发生

颠换的位点为 12 个,转换与颠换共同存在的位点为 4 个(表 1);变异均匀地分布于序列各个区域,但有明显的密码子偏好,主要发生在编码区密码子的第

3 位上,占变异位点的 81.0%,其他变异均发生在 1 和 2 位点上,分别占变异位点的 11.9%和 7.1%;在序列中未检测到插入或缺失位点。

表 1 短蛸 COI 基因序列单倍型及在群体中的分布

	1111222233	3333333444	4444555556	6 6							
	1222223466	6179359900	3566889345	6679344892	4 5	DL	QD	LY	SH	ZS	GZ
	4023890325	8634013408	8628092115	1405025499	7 0						
H1	TAACTCTCTA	CTGATTTCATC	TAATTCCTTT	TTTCTTCTC	C T	5	5	4			
H2A.....	5					
H3	C.....	...		1				
H4T.....		1	1			
H5	T..		2	3			
H6T....		1				
H7	...A.GT..T.....				1		
H8	.TT.....				1		
H9	...T...C.	G...GCC.CT	C.CACTTCC.	...ACCTCT	.A					9	
H10	C..T...C.	G...GCC.CT	C.CACTTCC	...ACCTCT	.A					1	
H11	...T...C.	A.AG.CC...	C.CACTTCC.	.C...CCTCT	...						1
H12	...T...C.	G...GCC.CT	C.CACTTCC.	...ACCTCT	...						4
H13	...T...C.	A.A..CCT.T	CCCCTTCCC	..C..CCTCT	...						2
H14	...T...CT	A.A..CCT..	C.CACTTCC.	.C.A.CCTCT	...						1
H15	...T...C.	A.A.GCC...	CCCCTTCC.	.C.C.CCTCT	...						1
H16	...T...C.	A.AGGCC...	C.CACTTCC.	.C...CCTCT	...						1
H17	...T...C.	ACA.GCC..T	C.CACTTCC.CCTCT	.A						1
H18	...T...C.	A.A..CC...	C.CACTTCC.CCTCT	.A						1
H19	...T...C.	A.A.GCC..T	C.CACTTCC.	..C..CCTCT	.A						1
H20	...T...C.	ACA.GCC...	C.CACTTCC.CCTCT	.A						1
H21	...T...C.	ACA.GCC...	C.CACTTCC.CCTCT	.A						4
H22	...T...C.	ACA.GCC...	C.CACTTCC.	.C...CCTCT	.A						1
H23	...T...C.	AGAGGCC...	C.CACTTCC.CCTCT	.A						1

注:DL,QD,LY,SH,ZS,GZ 分别代表大连、青岛、连云港、上海、舟山、广州群体。

3.2 短蛸群体的遗传多样性分析

用 DNAsp4.10 软件对各短蛸群体的遗传变异参数进行统计,结果如表 2 所示。60 个个体共有 23 个单倍型,其中大连群体为 2 个,青岛群体为 5 个,连云港群体为 5 个,上海群体为 2 个,舟山群体为 6 个,广州群体为 7 个;总单倍型多样性指数(H)为 0.909,核苷酸多样性指数(Pi)为 0.0203,平均核苷酸差异数(K)为 13.302,显示出较丰富的遗传多样性。对 6 个群体的遗传变异参数进行比较,发现大连、上海群体的遗传多样性相

对较低,2 个群体的 H ,核苷酸多样性指数值和核苷酸差异数值分别为 0.200~0.556,0.0003~0.0009 和 0.200~0.556,而其他 4 个群体的遗传多样性则相对较高,4 群体的 H ,核苷酸多样性指数值和核苷酸差异数值分别为 0.756~0.867,0.0015~0.0097,0.956~6.311,基本呈现出北部沿海相对较低、南部相对较高的趋势。

3.3 短蛸群体的遗传分化与基因流

对 6 个群体的 COI 基因序列进行比较,结果表明群体间存在一定的核苷酸差异,其中大连、青

岛、连云港群体与其他3个群体存在20个固定位点的差异,大连、青岛、连云港群体之间,上海、舟山和广州群体之间也存在部分位点的差异,如表1所示。遗传参数统计表明,6个群体在单倍型多样性指数、核苷酸多样性指数等遗传参数上也存在较大的差异,如表2所示。对群体间分化系数和基因流进行检测表明,6个群体间除青岛和连云港群体之外均具显著的遗传分化($P < 0.05$),其中大连、青岛、连云港3个群体与其他3个群体之间分化最为显著,分化系数均在0.8602以上,基因流

均大于1;青岛、连云港群体间无显著分化($P > 0.05$),大连与青岛、连云港群体之间虽分化显著($P < 0.05$),但仍具有一定的基因流($Nm > 1$),结果见表3。对基因流与群体地理距离关系进行作图表明,基本呈现随地理距离增加基因流减少的趋势($r^2 = 0.3198$),如图1所示。AMOVA分析进一步显示群体间遗传差异有12.72%存在于群体内部,87.28%存在于群体之间,这进一步证实了短蛸群体间的分化。

表2 短蛸种群的遗传变异参数统计

变异参数统计	大连群体	青岛群体	江苏连云港	上海群体	舟山群体	广州群体
分析个体数	10	10	10	10	10	10
单倍型数	2	5	5	2	6	7
单倍型多样性指数	0.556±0.075	0.756±0.130	0.800±0.100	0.200±0.024	0.844±0.103	0.867±0.107
核苷酸多样性	0.0009±0.0001	0.0015±0.0004	0.0028±0.0009	0.0003±0.0002	0.0097±0.0010	0.0029±0.0007
平均核苷酸差异数	0.556	0.956	1.822	0.200	6.311	1.875

表3 短蛸种群的遗传分化和基因流

群体	大连群体	青岛群体	连云港群体	上海群体	舟山群体	广州群体
大连群体	—	1.5458	1.9108	0.0362	0.0994	0.0297
青岛群体	0.2444 ($P < 0.05$)	—	13.1986	0.0407	0.1027	0.0333
连云港群体	0.2074 ($P < 0.05$)	0.0365 ($P > 0.05$)	—	0.0219	0.1050	0.0434
上海群体	0.9325 ($P < 0.01$)	0.9246 ($P < 0.01$)	0.9581 ($P < 0.01$)	—	0.6834	0.2077
舟山群体	0.8341 ($P < 0.01$)	0.8296 ($P < 0.01$)	0.8265 ($P < 0.01$)	0.4225 ($P < 0.01$)	—	0.8687
广州群体	0.9439 ($P < 0.01$)	0.9376 ($P < 0.01$)	0.9202 ($P < 0.01$)	0.7065 ($P < 0.01$)	0.3653 ($P < 0.01$)	—

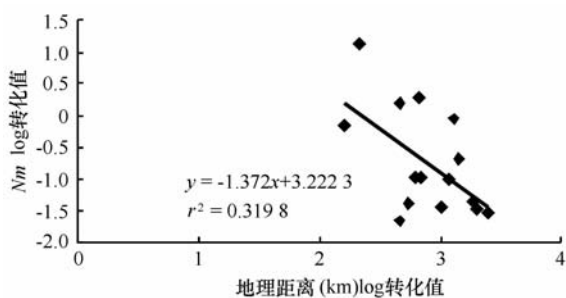


图1 种群基因流与地理距离间的相关性分析

3.4 短蛸群体的聚类分析和遗传距离

采用Mega 3.1软件对60个个体进行UPGMA聚类分析,结果表明,所有个体可以明显聚为2个类群,一个由大连、青岛和连云港群体的个体组成,另一个由上海、舟山、广州群体的个体组成,如图2所示。根据6个群体的遗传距离进一步作群体聚类分析表明,上海、舟山和广州3个群体由于遗传距离较近首先聚为一类,而大连、青岛和连云港群体另聚为一类(见图3)。遗传距离分析表明,两类群间的遗传距离达到了0.036。对COI基因编码的氨基酸序列进行分析表明,两类群间的遗传差异已造成其编码蛋白质

的固定氨基酸残基替换,如图 4 所示。对两类群进行 Tajima 的 D 和 F_u 的 F_S 检验,结果表明大连和青岛群体可能经历过种群扩张(Tajima 的 $D < 0$, F_u 的 $F_{St} < 0$, $P < 0.05$),而其他 4 个群体可能未经历过历史扩张事件(Tajima 的 $D > 0$, F_u 的 $F_{St} < 0$, $P > 0.05$)。

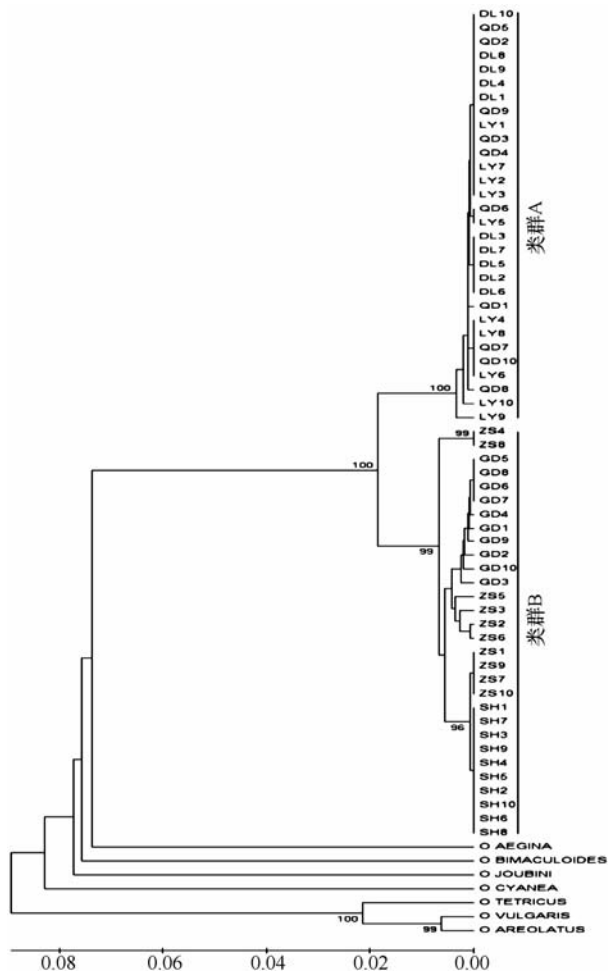


图 2 短蛸 60 个个体的 UPGMA 聚类分析

DL 代表大连群体, QD 代表青岛群体, LYG 代表连云港群体, ZS 代表舟山群体, SH 代表上海群体, GZ 代表广州群体

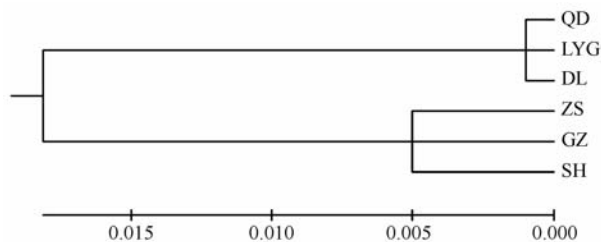


图 3 短蛸 6 个群体的聚类分析

DL 代表大连群体, QD 代表青岛群体, LYG 代表连云港群体, ZS 代表舟山群体, SH 代表上海群体, GZ 代表广州群体

4 讨论

一般认为物种的遗传变异往往能体现物种对环境变化的适应力,遗传变异较低的物种往往具有较低的种群恢复力和较高的种群灭绝风险,相反,遗传变异较高的物种则具有较高的进化潜能和生态适应性^[23]。海洋头足类被公认为是遗传变异相对贫乏的生物类群,以往的研究数据表明,除个别种类外^[24]海洋头足类均显现出较低的遗传变异水平,如此低的遗传变异水平通常仅发生在种群严重衰退的群体中,而在任何其他的无脊椎动物群体中则很少见^[15],这是否意味着海洋头足类具有相对较弱的生态适应性还未可知,但本文的研究结果却颇出人意料,COI 基因分析表明我国的短蛸群体存在着相对较高的遗传多样性。单倍型多样性指数和核苷酸多样性指数是两个最能反映遗传多样性的指标^[23]。从单倍型多样性指数来看,从 60 个短蛸个体中共检测到 23 个单倍型,多样性指数达 0.909,各群体除大连和上海群体外,多样性指数值均在 0.756 以上,这种较为丰富的单倍型多样性在海洋头足类中是少见的,比已研究的真蛸(*Octopus vulgaris*)^[11]、曼氏无针乌贼(*Sepiella maindroni*)^[25]、鱿鱼(*Thysanoteuthis rhombus*)^[26]、鹦鹉螺(*Nautilus pompilius*)^[14]等部分头足类种类要高,甚至比部分海洋鱼类、虾蟹类和贝类的多样性还要高^[27-29]。从核苷酸多样性指数来看,我国短蛸群体的总体核苷酸多样性指数为 0.020 3,各群体除大连和上海群体较低外,也均在 0.0015 以上,也与已报道的多种海洋生物种类相当^[30-31]。这说明尽管较低的遗传多样性在众多的头足类中已被证实,但部分种类仍可能具有相对较高的多样性^[24]。我国短蛸群体相对较高的遗传多样性预示着较高的生态适应性和进化潜能,为今后我国该资源的开发和利用奠定了良好的基础。

我国短蛸群体不仅存在着较丰富的遗传多样性,而且还存在较广泛的地理变异。这种变异在 COI 基因序列和遗传变异参数上均有所体现。遗传分化检验和基因流是衡量群体分化的两个重要指标,本文的研究结果表明我国短蛸群体除青岛和连云港群体外分化均达到显著水平($P < 0.05$);除大连、青岛和连云港 3 群体间外,基因流也均小于 1,说明群体间基因流很低,确实发生了明显分化^[32],随后的 AMOVA 检测也证实了这一点。我国短蛸

群体广泛的地理变异可能正说明该资源在自然海域的扩散能力是相当有限的,因为较强的扩散能力往往造成广泛的基因流进而促成种群遗传均质性^[5]。按照公式 $y = -1.372x + 3.2223$ 计算,短蛸群体在我国海岸线的扩散能力可能不超过 110 km,这与短蛸群体在海区中营相对固定的底栖生活习性相符^[19];群体间的基因流与地理距离呈负相关,即所谓的脚踏石模型^[33]也正好说明这一点,因为相对而言,脚踏石模型遗传结构更易发生在扩散能力相对较小的物种中^[33]。对所有个体进行的 UPGMA 聚类表明,6 个短蛸群体已明显地分化为两个类群,两者的分化系数达到 0.860 2,而且达到极显著水平 ($P < 0.01$),两者的基因流则仅有 0.081 26。为更好地展示两类群间的分化程度,引入同属的砂蛸 (*O. aegina*)、儒氏蛸 (*O. joubini*)、水母蛸 (*O. cyanea*)、双斑蛸 (*O. bimaculoides*)、真蛸 (*O. vulgaris*)及 *O. areolatus* 和 *O. tetricus* 作为外群进行聚类,结果发现 6 个短蛸群体与这些外群间有更明显的遗传差异,因此认为短蛸两类群的分化仍属种内群体间的分化水平,但鉴于两者的遗传距离已达 0.036,而且产生了 20 个核苷酸和 2 个氨基

酸固定位点的差异,其分化程度甚至高于部分头足类种间的差异^[22,34],也与部分已知物种亚种间的遗传分化相当^[35-36],因此对该两类群间的确切分化水平还有必要作深入的研究。至于两类群分化的原因目前还不清楚,一般认为海域水文条件、物种生态特征和生活史等均可造成海洋生物的分化^[37-39],近年来地理历史因素对海洋生物分化的推动作用也引起人们的关注^[29]。对于短蛸而言,相对固定的底栖生活和水文条件可能是造成两类群分化的重要原因,如两类群的分化基本以长江为界,可能正是由于长江口淡水的注入导致南北短蛸群体不能相互交流,再加上其本身的固定底栖生活习性最终造成群体的分化,但是否有地理历史因素的参与目前还不明确。对两类群的分化时间进行估算表明,其分化时间大约为 $228 \times 10^4 \sim 640 \times 10^4$ a 前的更新世或更早时期(依据鱼类和虾蟹类的 0.5%~1.4% 每百万年的进化速率推断^[40]);该时期的冰期正是造成地球众多生物类群分化的重要原因^[29],该时期是否有特殊地理历史事件造成我国短蛸群体的分化还需结合更多地理学和生物学方面资料才能证实。

	1	1111111112	222222223	333333334	444444445	555555556	666666667	77777
	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	12345
CladeA	KDIGTLYFIF	GIWSGLLGTS	LSLIIRTELG	QPGSLLNDQD	LYNVIVTAHA	FVIIFFLVIP	VIIGGF3NWL	VPLIL
CladeBR.....
			111111	1111111111	1111111111	1111111111	1111111111	11111
	7777888888	8888999999	9999000000	0000111111	1111222222	2222333333	3333444444	44445
	6789012345	6789012345	6789012345	6789012345	6789012345	6789012345	6789012345	67890
CladeA	GAPDIAFPRI	NNIRFWLLPP	SLTLLSSAA	VERGAGTGW	VYPPLSSNLA	HIGPSVDLAI	FSLHLAGISS	ILGAI
CladeBR.....
	1111111111	1111111111	1111111111	1111111111	1111111112	2222222222	2222222	
	5555555556	6666666667	7777777778	8888888889	9999999990	0000000001	1111111	
	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567	
CladeA	NFITTIINIR	WEGILIERLP	LFVWSVFITA	VLLLLSLPVL	AGAITILLTD	RNFNTIFFDP	RGGGDPI	
CladeB	

图4 短蛸两类群间 COI 基因编码的氨基酸序列差异

本研究结果对我国短蛸资源的开发具有重要的启示。研究结果表明我国短蛸群体间存在较大的遗传分化,特别是大连、青岛和连云港所处的黄海、渤海群体和上海、舟山和广州所处的东海和南海群体之间分化尤其明显,因此在今后的开发和管理中需区别对待,特别是大连、青岛和连云港群体,由于它

们的遗传多样性相对偏低,而且代表一个独立的进化显著单元,因此在今后的开发和管理中需要特别重视;舟山和广州群体由于具有相对较高的遗传多样性,可能是我国短蛸资源遗传变异的中心,因此在今后的开发和管理中也需要重视,它们将在今后的人工增殖开发和资源保护中占有重要的地位。

参考文献:

- [1] TUDELA S, GARCA-MARN J L, PLA C. Genetic structure of the European anchovy, *Engraulis encrasicolus*, in the north-west Mediterranean[J]. J Exp Mar Biol Ecol, 1999, 234: 95—109.
- [2] AMARAL A, SEQUEIRA M, MARTÍNEZ-CEDEIRA J, et al. New insights on population genetic structure of *Delphinus delphis* from the northeast Atlantic and phylogenetic relationships within the genus inferred from two mitochondrial markers[J]. Marine Biology, 2007, 151(5):1967—1976.
- [3] LINTAS C, HIRANO J, ARCHER S. Genetic variation of the European eel (*Anguilla anguilla*)[J]. Molecular Marine Biology and Biotechnology, 1998, 7(4): 263—269.
- [4] FRANKHAM R. Conservation genetics[J]. Annual Review of Genetics, 1995, 29:305—327.
- [5] HAN Z Q, GAO T X, TAKASHI Y, et al. Genetic population structure of *Nibea albi flora* in Yellow Sea and East China Sea [J]. Fisheries Science, 2008, 74: 544—552.
- [6] 权洁霞, 戴继勋, 尚迅. 海洋生物遗传多样性研究现状[J]. 青岛海洋大学学报, 1999, 29(2):283—288.
- [7] PAYNE A G, AGNEW D J, PIERCE G J. Trends and assessment of cephalopod fisheries[J]. Fisheries Research, 2006 78:1—3.
- [8] SHAW P W. Polymorphic microsatellite DNA markers for the assessment of genetic diversity and paternity testing in the giant cuttlefish, *Sepia apama* (Cephalopoda) [J]. Conservation Genetics, 2003, 4: 533—535.
- [9] PÉREZ-LOSADA M, GUERRA A, SANJUAN A. Allozyme electrophoretic technique and phylogenetic relationships in three species of *Sepia*(Cephalopoda: Sepiidae)[J]. Comp Bioc Physiol, 1996,114:11—18.
- [10] VITTURI R, RASOTTO M B, FARINELLA-FERRUZZA N. The chromosomes of 16 molluscan species[J]. Boll Zool, 1982, 49: 61—71.
- [11] TESKE P R, OOSTHUIZEN A, Papadopoulos I, et al. Phylogeographic structure of *Octopus vulgaris* in South Africa revisited: identification of a second lineage near Durban Harbour[J]. Mar Biol, 2007, 151: 2119—2122.
- [12] SANDS C J, JARMAN S N, JACKSON G D. Genetic differentiation in the squid *Moroteuthis ingens* inferred from RAPD analysis[J]. Polar Biol, 2003, 26: 166—170.
- [13] SHAW P W. Polymorphic microsatellite DNA markers in the veined squid *Loligo forbesi* [J]. Molecular Ecology, 1997, 6: 297—298.
- [14] SINCLAIR W, BRISKEY L, ASPDEN W, et al. Genetic diversity of isolated populations of *Nautilus pompilius* (Mollusca, Cephalopoda) in the Great Barrier Reef and Coral Sea[J]. Reviews in Fish Biology and Fisheries, 2007, 17: 223—235.
- [15] 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.
- [16] CARVALHO G R, Thompson A, STONER A L. Genetic diversity and population differentiation of the shortfin squid *Illex argentinus* in the south-west Atlantic [J]. Exp. Mar. Biol. Ecol,1992, 158: 105—121.
- [17] KASSAHN K S, DONNELLAN S C, FOWLER A J, et al. Molecular and morphological analyses of the cuttlefish *Sepia apama* indicates a complex population structure [J]. Marine Biology,2003, 143: 947—962.
- [18] YEATMAN J, BENZIE J A. Genetic structure and distribution of *Photololigo* spp. in Australia [J]. Marine Biology, 1994, 118:79—87.
- [19] 董正之. 中国动物志:软体动物门,头足纲[K]. 北京:科学出版社, 1988.
- [20] 高强,王昭萍,王如才,等. 五个短蛸群体等位基因酶的遗传变异[J]. 海洋湖沼通报, 2002, 4: 46—51.
- [21] SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANIATIS T. Molecular cloning[K]//A Laboratory Manual, 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [22] LIN X Z, ZHENG X D, XIAO S. Phylogeny of the cuttlefishes (Mollusca: Cephalopoda) based on mitochondrial COI and 16S rRNA gene sequence data[J]. Acta Oceanologica Sinica, 2004, 23(4): 699—70.
- [23] 杨金权,胡雪莲,唐文乔,等. 长江口邻近水域刀鲚的线粒体控制区序列变异与遗传多样性[J]. 动物学杂志,2008,43(1):8—15.
- [24] KATUGIN O N. Genetic variation in the squid *Beryteuthis magister* (Breyer, 1913) (Oegopsida: Gonatidae)[M]//OKUTANI T, O'DOR R K, KUBODERA T. Recent Advances in Fisheries Biology. Tokyo: Tokai University Press, 1993.
- [25] ZHENG X D, WANG R C, WANG X F, et al. Genetic variation in population of the common Chinese cuttlefish *Sepiella maindroni* (Mollusca: Cephalopoda) using allozymes and mitochondrial DNA sequence analysis [J]. J Shellfish Res, 2001, 20: 1159—1165.
- [26] KITAURA J, YAMAMOTO G, NISHIDA M. Genetic variation in populations of the diamond-shaped squid *Thysanoteuthis rhombus* as examined by mitochondrial DNA sequence analysis [J]. Fisheries Science, 1998, 64(4): 538—542.
- [27] 马凌波,张凤英,乔振国,等. 中国东南沿海青蟹线粒体 COI 基因部分序列分析[J]. 水产学报, 2006, 30(4): 463—468.
- [28] IGUCHI A, TAKAI S, UENO M, et al. Comparative analysis on the genetic population structures of the deep-sea whelks *Buccinum tsubai* and *Neptunea constricta* in the Sea of Japan [J]. Mar Biol, 2007, 151: 31—39.
- [29] LIU Y, LIU R L, YE L C, et al. Genetic differentiation between populations of swimming crab *Portunus trituberculatus* along the

- coastal waters of the East China Sea[J]. *Hydrobiologia*, 2009, 618:125—137.
- [30] ARNAUD S, MONTEFORTE M, GALTIER N, et al. Population structure and genetic variability of pearl oyster *Pinctada mazatlanica* along Pacific coasts from Mexico to Panama [J]. *Conservation Genetics*, 2000, 1: 299—307.
- [31] KHAMNAMTONG B, KLINBUNGA S, MENASVETA P. Genetic diversity and geographic differentiation of the giant tiger shrimp (*Penaeus monodon*) in Thailand analyzed by mitochondrial COI sequences [J]. *Biochem Genet*, 2009, 47:42—55.
- [32] MILLAR C L, LIBBY W J. Strategies for conserving clinal, ecotypic, and disjunct population diversity in widespread species[M]//FALD D A, HOLSINGER K E. *Genetics and Conservation of Rare Plants*. New York: Oxford University Press, 1991:149—170.
- [33] PALUMBI S R. Population genetics, demographic connectivity, and the design of marine reserves[J]. *Ecological Applications: Supplement*, 2003, 13(1): 146—158.
- [34] ZHENG X D, YANG J M, LIN X Z, et al. Phylogenetic relationships among the *Decabrachia cephalopods* inferred from mitochondrial DNA sequences[J]. *Journal of Shellfish Research*, 2004, 23(3): 881—886.
- [35] 郑芳, 吕秀玲, 孙红英, 等. 基于线粒体 COI 基因序列探讨长江华溪蟹的遗传分化[J]. *南京师范大学学报:自然科学版*, 2006, 29(2): 103—105.
- [36] 孔晓瑜, 喻子午, 刘亚军, 等. 中华绒螯蟹与日本绒螯蟹线粒体 COI 基因片段的序列比较研究[J]. *青岛海洋大学学报*, 2001, 31(6): 861—866.
- [37] RIGINOS C, VICTOR B C. Larval spatial distributions and other early life history characteristics predict genetic differentiation in eastern *Pacific blennioid* fishes[J]. *Proc R Soc Lond: B*, 2001, 268:1931—1936.
- [38] MUSS A, ROBERTSON D R, STEPIEN C A, et al. Phylogeography of Ophioblennius: the role of ocean currents and geography in reef fish evolution[J]. *Evolution*, 2001, 55: 561—572.
- [39] RUZZANTE D E, TAGGART C T, Cook D A. Nuclear DNA basis for shelf-and bank-scale population structure in northwest Atlantic cod (*Gadus morhua*): Labrador to Georges bank[J]. *Molecular Ecology*, 1998, 7: 1663—1680.
- [40] KNOWLTON N, WEIGT L A. New dates and new rates for divergence across the Isthmus of Panama[J]. *Proc R Soc Lond*, 1998, 265: 2257—2263.

Genetic variation of *Octopus ocellatus* populations in China's coastal waters based on the COI gene analysis

LÜ Zhen-ming¹, LI Huan¹, WU Chang-wen¹, FAN Zhen-jiao¹, ZHANG Jian-she¹

(1. Zhejiang Provincial Key Laboratory of Marine Culture Equipment and Technology, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316000, China)

Abstract: Studies on genetic variation in marine organisms are an important component of successful and sustainable management of marine fishery resources. Genetic variation of six *Octopus ocellatus* populations in China's coastal waters were investigated using the mitochondrial gene(COI) sequencing method. Results show that, compared with other cephalopod species, *O. ocellatus* shows higher genetic diversity in populations. 42 polymorphic sites were detected in 654 bp aligned sequence, which represented for 6.42% of the total length of sequenced COI gene. 23 haplotypes were detected out of 60 individuals from six populations. The haplotype diversity, mean nucleotide diversity and average number of nucleotide differences reached 0.200~0.867, 0.000 3~0.009 7, 0.200~6.311, respectively. Molecular variance analysis revealed strong genetic structure in six *O. ocellatus* populations ($P < 0.05$). A pattern of genetic-isolation-by-distance, conforming to a stepping stone model, was detected when plotting gene flow against geographic distance. UPGMA tree constructed shows that six *O. ocellatus* populations studied can be divided into two lineages. One is consisted of Dalian, Qingdao, Lianyungang populations. The other is consisted of other three populations. Between them, 20 fixed nucleotide sites and two fixed amino acid sites substitute were detected along the gene sequence and coded protein, respectively. The F_{st} between them reached 0.8602

($P < 0.01$) and the gene flow between them turned out to be much lower than 1. AMOVA test, which showing 12.72% of the genetic variation lies within populations and 87.28% lies between populations, further suggested the genetic differentiation between these two lineages. These findings in the aspect of genetic variation of *O. ocellatus* will contribute to better exploitation and refined management of this precious cephalopod resources along the coast of China in future.

Key words: geographical population; *Octopus ocellatus*; genetic variation