

# 中国沿海 7 个长蛸(*Octopus variabilis*) 群体 COI 基因的遗传变异研究\*

常抗美 李 焕 吕振明 迟长凤

(浙江海洋学院海洋科学学院 浙江省海洋养殖装备与工程技术重点实验室 舟山 316004)

**摘要** 采用线粒体 DNA 细胞色素氧化酶亚基 I(COI)基因序列测定技术分析了中国沿海重要经济头足类长蛸 7 个野生群体的种群遗传结构及其变异。结果表明,我国长蛸资源存在相对丰富的遗传多样性,635bp 长度的核苷酸片段共检测到 74 个多态位点,多态位点比例达 11.7%,检测的 108 个个体中共获 25 个单倍型,单倍型多样性指数( $H$ )达 0.342—0.934,平均核苷酸多样性指数( $Pi$ )达 0.0008—0.0055,高于多数海洋头足类的遗传变异。对 7 个群体的遗传结构进行检测表明,我国的长蛸群体间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。7 个群体可明显聚类为 3 个类群,类群间分化系数  $F_{st}$  达 0.8858 ( $P < 0.01$ ),基因流大大小于 1;AMOVA 检测和单倍型网络关系图也证实了上述类群的分化。遗传距离分析表明,由厦门群体组成的类群与其它 2 类群间的遗传距离达到 0.086—0.098,可能达到了亚种的分化。

**关键词** 长蛸, 细胞色素氧化酶亚基 I, 遗传变异

**中图分类号** Q953

海洋生物的种群扩散力是影响其种群结构和遗传分化的重要因素(Pfeiler *et al.*, 2005),一般而言,物种的种群扩散力越强,其基因交流所遇阻隔越小,种群遗传结构就越简单,遗传分化越小;相反,那些种群扩散能力弱、缺乏长距离种群扩散机制(如幼体的浮游或成体的洄游)的物种,其基因交流在较短距离内就可以形成地理阻隔,进而产生遗传分化(Liu *et al.*, 2007; Riginos *et al.*, 2001)。穴居生物就是一种种群扩散力相对较弱的生物类群,在海洋环境中,穴居意味着活动时间和范围的限制,而且通过将卵产于洞穴进行孵化还限制了后代群体的扩散,因此更易阻断群体间正常的基因交流从而产生群体分化;其最直接的例子是墨西哥湾的幽灵虾(Bilodeau *et al.*, 2005)和加勒比海域的枪虾(Mathews, 2007);类似的例子在其它水生生物中也有发现(Daniels *et al.*, 2002)。

长蛸(*Octopus variabilis*)是一种典型的营底栖穴

居生活的海洋头足类,属软体动物门(Mollusca)、头足纲(Cephalopoda)、蛸科(Octopodidae)、蛸属(*Octopus*)动物,广泛分布于黄海、渤海、东海和南海海域的内湾和浅海中,是我国重要的海洋经济头足类(董正之, 1988)。长蛸的穴居习性和生活史预示着较小的种群扩散力,并暗示较短的地理隔离即可阻止群体间的基因交流,从而产生遗传分化,然而到目前为止,有关我国沿海长蛸群体内部可能存在的种群结构及遗传分化则知之甚少。仅见高强(2003)<sup>1)</sup>采用等位酶技术对渤海海域 3 地的长蛸群体的遗传变异分析,但结果并未检测出明显的遗传分化,因而对我国沿海长蛸群体的确切种群遗传结构有必要做进一步研究。

本研究在此背景下,采用线粒体基因序列分析技术对黄海、渤海、东海 7 个地理群体长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,检测我国长蛸群体中常规形态学无法反映的微

\* 国家科技支撑计划项目,2007BAD43B00 号。常抗美,教授,E-mail:chang kangmei@yahoo.com.cn

1) 高 强,2003. 短蛸和长蛸群体的等位基因酶遗传变异研究. 青岛:中国海洋大学硕士学位论文

通讯作者:李 焕,E-mail:lihuan1517@163.com

收稿日期:2009-04-13,收修改稿日期:2009-06-28

细遗传差异和遗传结构, 以期为我国长蛸种质资源的合理开发、管理和保护提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

长蛸(*Octopus variabilis*)样品取自渤海、黄海、东海海域, 采集地点分别为辽宁大连, 山东烟台、青岛, 江苏连云港, 浙江舟山、温州, 福建厦门, 样本取新鲜肌肉保存于95%酒精, 带回实验室备用。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 基因组 DNA 的提取** 参照《分子克隆实验指南》(Sambrook *et al.*, 2002), 采用常规的酚-氯仿法提取基因组 DNA, 双蒸水溶解后置于 -20 保存备用。

**1.2.2 COI 基因扩增和测序** COI 序列的扩增参照 Lin 等(2004)的方法, 稍加改进。具体方法为: 扩增引物 COI<sub>f</sub>: 5'-TAAACTTGAGGGTGACCAAAAAT-3'; COI<sub>r</sub>: 5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTG-3', 引物由上海英骏生物技术有限公司合成; PCR 反应体系总体积为 50 $\mu$ l, 其中含模板 DNA 50—100ng, 2.0mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.2mmol/L 每种 dNTPs, 0.2 $\mu$ mol/L 每个引物, 3U *Taq* 酶及 1 $\times$  缓冲液; 反应程序为: 94 预变性 5min 后, 94 变性 1min, 51 退火 1min, 72 延伸 1min, 共 35 个循环, 最后 72 延伸 5min。PCR 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 凝胶成像系统下观察并拍照记录。PCR 产物纯化后送至 Invitrogen 公司测序。

**1.2.3 数据分析** DNA 序列采用 Clustal X1.83 (Thompson *et al.*, 1997)软件进行编辑、校对和排序; 采用 DNAsp4.10 (Rozas *et al.*, 2003)软件对多态位点数、单倍型数、转换与颠换数、核苷酸多样性指数( $P_i$ )、单倍型多样性指数( $H$ )、平均核苷酸差异数( $K$ )等遗传多样性参数进行计算; 采用 Mega3.1 (Kumar *et al.*, 2004)软件进行遗传距离计算和聚类分析, 系统树采用 UPGMA 模型构建, 并采用 bootstrap(重复次数 1000)检验聚类树各分支置信度; 此外, 用 Arlequin 3.01 (Excoffier *et al.*, 2005)软件中的分子变异分析 (AMOVA)方法估算遗传变异在群体内和群体间的分布, 并计算群体间遗传分化系数( $F$ -statistics,  $F_{st}$ )及其显著性(重复次数 1000), 群体间基因流  $Nm$  由公式  $Nm = (1 - F_{st})/2F_{st}$  计算而得。采用 Tajima's  $D$  检验和 Fu's  $F_s$  检验来检测中性假说是否成立, Tajima's  $D$  和 Fu's  $F_s$  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(吴常文等, 2009)。

## 2 结果

### 2.1 COI 基因的序列组成及变异

采用 Clustal X1.83 软件对我国 7 个长蛸群体共 108 个个体的 COI 序列编辑和比对后, 得到 635bp 的同源序列。经 Mega 3.1 软件分析, 该序列的 A、T、C、G 碱基的平均含量为 30.2%、37.0%、18.0%、14.8%。A+T 的含量 67.2%, 明显高于 G+C 的含量 32.8%, 符合 COI 基因的一般特点。DNAsp4.10 软件分析显示, 108 个个体共检测到 74 个变异位点, 占分析位点总数的 11.7%, 其中单突变位点 6 个, 简约信息位点 68 个。变异位点中发生转换的位点 53 个, 发生颠换位点 20 个, 转换与颠换共同存在的位点 1 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 83.8%, 其它变异均发生在 1 位点上, 占变异位点的 16.2%; 序列未检测到插入或缺失位点。多态性遗传参数统计显示, 108 个个体共检出 25 个单倍型, 其中大连群体 4 个, 烟台与青岛群体均为 7 个, 连云港群体 9 个, 舟山群体 5 个, 温州群体 6 个, 厦门群体 3 个; 总群体单倍型多样性指数( $H$ )为 0.905, 核苷酸多样性指数( $P_i$ )为 0.0310, 平均核苷酸差异数( $K$ )为 19.789, 显示出较丰富的遗传多样性。

### 2.2 长蛸群体的遗传结构分析

对 7 个群体的 COI 基因序列进行比对, 结果表明, 各群体无论在核苷酸组成上还是在遗传参数上均存在着显著差异。在核苷酸组成上, 大连、烟台、青岛、连云港、舟山 5 群体核苷酸组成较为相似, 但它们与厦门群体却存在 59 个固定核苷酸的差异, 它们与温州群体间也存在 14 个固定位点的差异, 而温州与厦门群体之间也存在 51 个固定位点的差异, 如表 1 所示。在遗传参数上, 7 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别, 如表 2 所示; 对群体间分化系数( $F_{st}$ )和基因流( $Nm$ )进行检测表明, 7 群体内存在明显的遗传结构, 其中大连、烟台、青岛、连云港、舟山 5 群体与温州、厦门群体遗传分化最为显著( $P < 0.01$ ), 5 群体与温州群体的分化系数达 0.8236 ( $P < 0.01$ ), 基因流仅 0.1071; 5 群体与厦门群体的分化系数达 0.9512 ( $P < 0.01$ ), 基因流仅 0.0257; 温州群体与厦门群体的分化系数和基因流也分别达 0.9866 和 0.0068; 而 5 群体内部, 除舟山群体与其它 4 群体间外, 均无显著的遗传分化( $P > 0.05$ ), 结果见表 3; 对基因流与群体地理隔离距离关系分析



表 2 长蛸群体的遗传变异参数统计  
Tab.2 Statistics of genetic variation parameters in *O. variabilis* populations

变异参数	群体						
	大连	烟台	青岛	连云港	舟山	温州	厦门
个体数	15	15	15	14	16	17	16
多态位点比例	0.940%	1.254%	1.254%	1.567%	1.097%	0.784%	0.470%
单倍型数	4	7	7	9	5	6	3
单倍型多样性指数( $H$ )	0.657±0.080	0.886±0.050	0.876±0.052	0.934±0.045	0.750±0.078	0.515±0.145	0.342±0.140
核苷酸多样性指数( $P_i$ )	0.0044±0.0004	0.0051±0.0004	0.0048±0.0005	0.0055±0.0006	0.0038±0.0006	0.0014±0.0005	0.0008±0.0004
平均核苷酸差异数( $K$ )	2.781	3.238	3.067	3.495	2.425	0.882	0.483
Tajima's $D$ 检验统计量	1.7752	1.1641	0.9075	0.4334	0.5269	- 1.3017	- 1.3492
$P$ 值	0.9700	0.9040	0.8400	0.6870	0.7340	0.0700	0.0630
Fu's $F_s$ 检验统计量	2.2628	- 0.4830	- 0.6352	- 2.5813	0.8234	- 2.9535	- 0.4415
$P$ 值	0.8800	0.3840	0.3470	0.0660	0.6830	0.0080	0.2640

表 3 长蛸群体间的遗传分化系数(对角线下)和基因流(对角线上)  
Tab.3 Genetic fixations index (below diagonal) and gene flow (above diagonal) among *O. variabilis* populations

群体	大连	烟台	青岛	连云港	舟山	温州	厦门
大连	—	11.7249	293.6176	28.5698	0.9846	0.0621	0.0139
烟台	0.0409*	—	12.4870	7.6566	1.2532	0.0700	0.0162
青岛	0.0017*	- 0.0385*	—	9.5000	1.0713	0.0671	0.0153
连云港	0.0172*	- 0.0613*	- 0.0500	—	1.3861	0.0733	0.0167
舟山	0.3368***	0.2852***	0.3182***	0.2651***	—	0.0620	0.0129
温州	0.8896***	0.8772***	0.8817***	0.8721***	0.8897***	—	0.0068
厦门	0.9729***	0.9686***	0.9703***	0.9676***	0.9749**	0.9866***	—

\*表示差异不显著( $P>0.05$ ); \*\*\*表示差异极显著( $P<0.01$ )

表明,基本呈现随距离增加基因流减少的趋势( $r^2 = 0.327$ )。AMOVA 分析进一步显示长蛸群体间的遗传差异有 10.20%存在于群体内部,89.80%存在于群体之间,进一步证实了长蛸群体内显著的遗传结构。

### 2.3 聚类分析和种群动态

采用 Mega 3.1 软件对 108 个个体进行 UPGMA 聚类分析(图 1),结果表明,所有个体可以明显聚为 3 支,一支由大连、烟台、青岛、连云港和舟山 5 群体的个体组成,一支由温州群体所有个体组成,而另一支由厦门群体所有个体组成;遗传距离分析表明,大连、烟台、青岛、连云港和舟山 5 群体与温州群体间遗传距离达到 0.025,而这 5 个群体与厦门群体间遗传距离达到 0.098,而温州群体与厦门群体间遗传距离也达到 0.086;对 COI 基因编码的氨基酸序列进行分析表明,3 支间的遗传差异已造成其编码蛋白质若干固定氨基酸残基的替换,如表 4 所示;采用简化的中介网络法对各类群单倍型网络关系图进行构建,也支持聚类分析的结果,如图 2 所示,网络关系图中

大连、烟台、青岛、连云港和舟山 5 群体以单倍型 H3 为中心聚为一支,而温州和厦门群体分别聚类。对这 3 个类群进行 Tajima's  $D$  和 Fu's  $F_s$  检验,结果表明,尽管 3 个类群中的许多群体的 Tajima's  $D$  和 Fu's  $F_s$  值为负值,但均未达到显著水平( $P>0.05$ ),因此不支持这些类群历史上经过种群扩张。

### 3 讨论

一般认为,海洋生物与陆生生物相比是一类种群结构和分化相对匮乏的生物类群,这种种群结构的匮乏缘于海洋环境缺乏象陆地环境一样阻止生物种群扩散和交流的有效屏障(Ward *et al*, 1994; Stabile *et al*, 1996)。这种现象在具有长距离运动能力的海洋生物中表现的尤为突出(Liu *et al*, 2007)。然而作为营底栖穴居生活的长蛸而言,则情况大不一样;从本研究的结果来看,我国沿海长蛸种群存在着明显的种群结构和遗传分化。遗传分化系数( $F_{st}$ )和基因流( $Nm$ )是两个最能反映遗传分化的指标,从  $F_{st}$  指数来看,

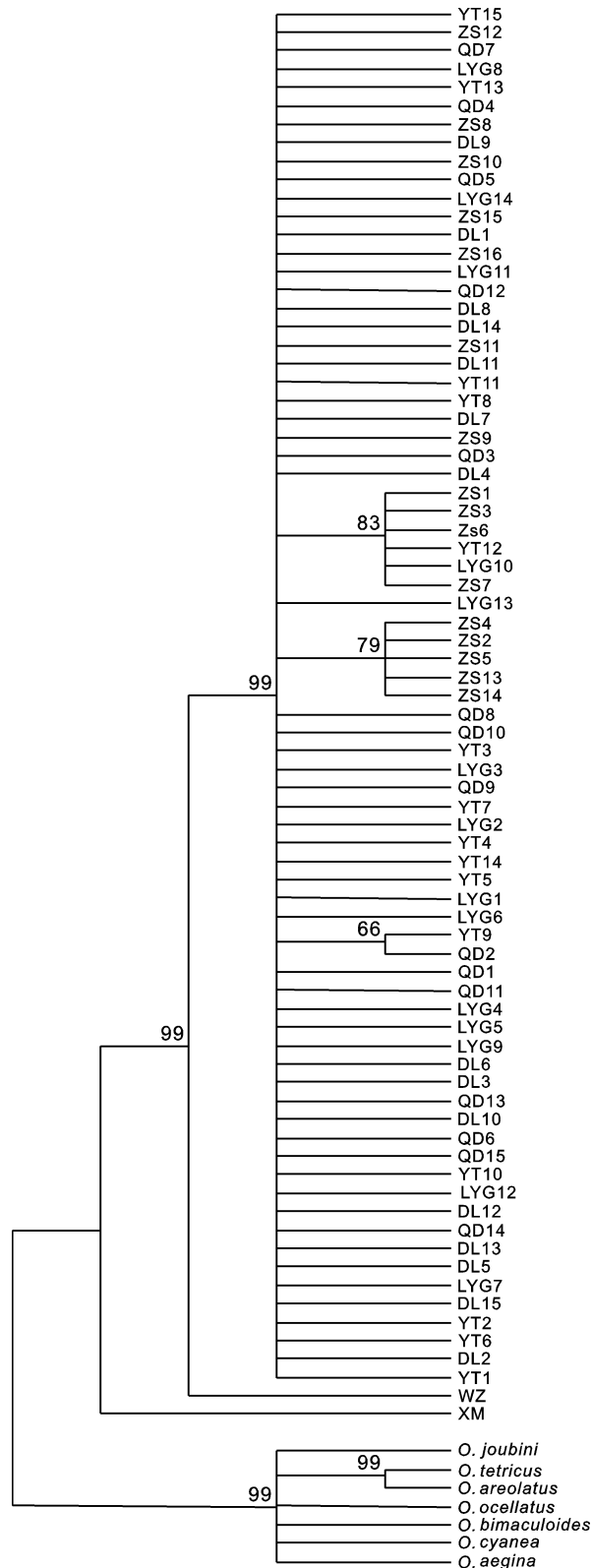


图 1 长蛸不同个体的 UPGMA 聚类分析图

Fig.1 UPGMA tree constructed from genetic distance among *O. variabilis* individuals

注: DL、YT、QD、LYG、ZS 分别代表大连、烟台、青岛、连云港、舟山群体; WZ、XM 分别代表温州、厦门群体所有个体

大连、烟台、青岛、连云港和舟山 5 群体与温州群体和厦门群体间的遗传分化系数达 0.8236—0.9512, 且均达到了极显著的分化 ( $P < 0.01$ ), 基因流则仅为 0.0068—0.1071; 而一般的认为是群体之间的  $Nm < 1$  就说明群体可能由于遗传漂变而发生了较大的分化 (Millar *et al*, 1991)。聚类分析更清楚的表明我国的长蛸种群已至少存在 3 个地理类群的分化, 一个由大连、烟台、青岛、连云港和舟山 5 群体组成, 一个由温州群体组成, 而另一个由厦门群体组成; 我国沿海长蛸种群的这种遗传结构可能正与其穴居的生活习性有关; 穴居一方面限制了长蛸种群在沿岸作长距离运动和迁徙, 另一方面洞穴也将产入其中的受精卵有效地保护起来, 防止了其卵子及幼体随洋流的长距离扩散, 从而使我国长蛸资源各地理群体间不能进行很好的基因交流, 最终导致了地理群体的分化; 这一点也可以从舟山和温州群体的较大的遗传分化上得到印证。从温州和舟山的海域距离来看, 两地仅相距约 270km, 但两地群体间却几乎没有很明显的基因流 ( $Nm = 0.0620$ ), 从这一点看, 我国长蛸群体在我国局部沿海的沿岸扩散能力可能不会超过 135km; 基因流与地理距离呈负相关性, 即所谓的脚踏石模型也可以说明这一点, 因为大量研究表明, 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 (Palumbi, 2003)。但这不能解释为何地理距离相当的大连、烟台、青岛、连云港和舟山 5 海域间长蛸群体遗传结构的相对均质性; 5 群体中除舟山群体外 ( $P < 0.01$ ), 群体间均不存在显著的遗传分化 ( $P > 0.05$ ); 一种可能的解释是这 5 个群体中的大连、烟台、青岛、连云港群体均位于黄、渤海海域, 更新世以来的冰期曾使该海域多次经历海平面的下降而曝为陆地, 冰期过后海水又通过海进由东海海槽侵入黄、渤海海域 (Liu *et al*, 2007; Han *et al*, 2008), 可能正是由于这种海平面的反复升降造成黄、渤海长蛸群体反复的迁入和迁出, 从而与东海部分海域(舟山)的长蛸群体产生广泛的基因交流。更新世以来的冰期造成的海平面反复升降使海洋生物遗传结构发生改变在许多物种中已多有报道 (Liu *et al*, 2007; Han *et al*, 2008; Hewitt, 2000)。

至于我国长蛸群体的遗传分化程度, 从本研究的结果来看, 3 个类群间的遗传分化系数达到 0.8236—0.9512, 且均达到极显著水平 ( $P < 0.01$ ), 基因流仅 0.0257—0.1071, 可见已经达到了较为严重的分化程度; 为更好地展示 3 类群间的遗传分化程度, 引入同

表 4 长蛸两类群间 COI 基因编码的氨基酸序列差异  
Tab.4 The variability of amino acid sequence coded by COI gene between two lineages of *O. variabilis*

	1	1111111112	222222223	333333334
	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890
其它群体	KDIGTLYFIF	GIWSGLLGTS	LRLIIRTELG	QPGSLLNDDQ
厦门群体	.....	.....	.....	.....
	444444445	555555556	666666667	777777778
	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890
其它群体	LYNVIVTAHA	FVIIFFLVIP	VIIGGFGNWL	VPLILGAPDI
厦门群体	.....	.....	.....	.....
		1	111111111	111111111
	888888889	999999990	000000001	111111112
	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890
其它群体	AFPRINNIRF	WLLPSSLTLL	LTSAAVERGV	GTGWTVPPL
厦门群体	..... S .	.....	.....	.....
	111111111	111111111	111111111	111111111
	222222223	333333334	444444445	555555556
其它群体	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890
厦门群体	SRNLAHTGPS	VDLAIFSLHL	AGISSILGAI	NFITTIINIR
	111111111	111111111	111111111	111111112
	666666667	777777778	888888889	999999990
	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890
其它群体	WEGIQIERLP	LFVWSVFITA	ILLLLSLPVL	AGAITILLTD
厦门群体	.....	.....	.....	.....
	222222222			
	000000001			
	1234567890			
其它群体	RNFNTTFDP			
厦门群体	.....			

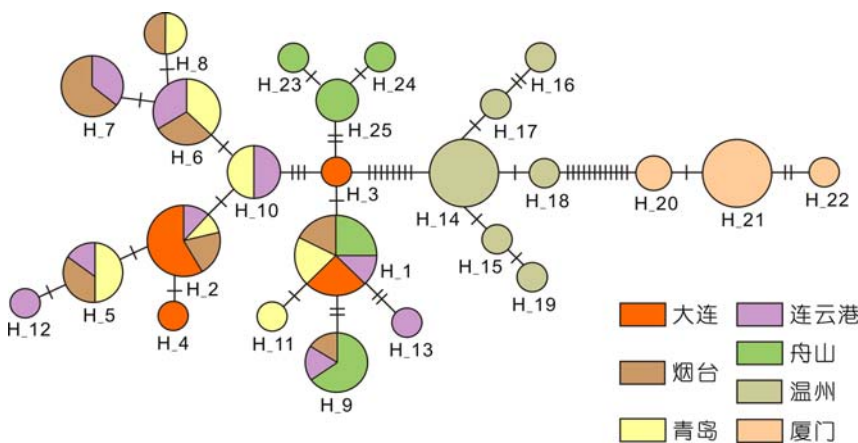


图 2 长蛸 7 个群体单倍型网络图

Fig.2 Reduced median network of haplotypes showing genetic relationship among haplotypes in *O. variabilis*

注: 圆圈面积与单倍型频率成正比, 短划线代表单倍型间的核苷酸替换数目

属的短蛸(*O. ocellatus*)、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* 作为外群并与所有长蛸群体一起作聚类分析, 结果发现 7 个长蛸群体与这些外群种之间有着更明显的遗传差异, 因此认为长蛸两类群的分化仍属种内的分化水平; 但鉴于 3 类群间的遗传距离已达 0.025—0.098, 特别是厦门类群与其它 2 类群间遗传距离达到了 0.086—0.098, 且产生了 51—59 个核苷酸和 1 个氨基酸固定位点的差异, 这么大的

遗传分化在头足类 COI 基因的遗传变异中是很少见的。在其它无脊椎动物中, 郑芳等(2006)通过 COI 基因序列的研究, 发现长江华溪蟹 3 个亚种间的遗传距离为 0.018—0.085。孔晓瑜等(2001)比较研究了中华绒螯蟹和日本绒螯蟹两个亚种的线粒体 COI 基因片段序列, 发现两者的核苷酸差异率为 4.86%, Harrison(2004)分析了豆蟹科(Pinnotheridae)的 *Austinixa* 属 7 个种的 COI 基因序列, 发现各个种之间 COI 基因的遗传距离介于 0.125—0.263。鉴于此, 作者认为本研究中厦门群体与其它 2 个类群的遗传分化可能已达到了亚种的分化水平。而温州群体与其它 5 个群体间的遗传距离仅 0.025, 与已研究的许多海洋生物群体间差异相当, 因此认为仍属种内群体间的分化, 但关于 3 个类群间的确切分化水平, 还需要结合更多的分子标记信息和形态学证据才能加以证实。

本研究结果对我国长蛸资源的开发、管理和保护具有重要的启示。研究结果表明, 我国沿海长蛸群体存在着较丰富的遗传多样性, 这样丰富的遗传多样性在海洋头足类中是少见的, 预示着我国长蛸资源相对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。同时我国沿海的长蛸资源还存在较大的种群结构和遗传分化, 特别厦门群体和其它两个类群之间分化尤其明显, 因此在今后的开发和管理中需区别对待; 温州群体虽然与其它 5 个群体的遗传分化可能未达到亚种的分化水平, 但其分化程度也是相当可观的, 可能代表了一个独立的进化显著单元, 因此在今后的开发和管理中也需得到应有重视, 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

- 孔晓瑜, 喻子牛, 刘亚军等, 2001. 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. 青岛海洋大学学报, 31(6): 861—866
- 吴常文, 许逸天, 吕振明等, 2009. 基于 D-LOOP 基因的中国沿海鳎鱼(*Ilisha elongata*)种群遗传结构研究. 海洋与湖沼, 40(3): 330—337
- 郑芳, 吕秀玲, 孙红英等, 2006. 基于线粒体 COI 基因序列探讨长江华溪蟹的遗传分化. 南京师范大学学报(自然科学版), 29(2): 103—105
- 董正之, 1988. 中国动物志. 软体动物门, 头足纲. 北京: 科学出版社, 181—182
- Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T, 2002. 黄培堂译, 分子克隆实验指南(第 3 版). 北京: 科学出版社, 463—471
- Bilodeau A L, Felder D L, Niegel J E, 2005. Population structure at two geographic scales in the burrowing crustacean *Callinectes islagrande* (Decapoda, Thalassinidea): Historical and contemporary barriers to planktonic dispersal. *Evolution*, 59(10): 2125—2138
- Daniels S R, Stewart B A, Cook P A, 2002. Congruent patterns of genetic variation in a burrowing freshwater crab revealed by allozymes and mtDNA sequence analysis. *Hydrobiologia*, 468: 171—179
- Excoffier L, Laval G, Schneider S, 2005. Arlequin ver.3.01: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1: 47—50
- Han Z Q, Gao T X, Takashi Y *et al*, 2008. Deep phylogeographic break among white croaker *Pennahia argentata* (Sciaenidae, Perciformes) populations in North-western Pacific. *Fisheries Science*, 74: 770—780
- Harrison J S, 2004. Evolution, biogeography, and the utility of mitochondrial 16S and COI genes in phylogenetic analysis of the crab genus *Austinixa* (Decapoda: Pinnotheridae). *Mol Phylogenet Evol*, 30: 743—754
- Hewitt G M, 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*, 405: 907—913
- Kumar S, Tamura K, Nei M, 2004. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*, 5: 150—163
- Lin X Z, Zheng X D, Xiao S, 2004. Phylogeny of the cuttlefishes (Mollusca: Cephalopoda) based on mitochondrial COI and 16S rRNA gene sequence data. *Acta Oceanologica Sinica*, 23(4): 699—709
- Liu J X, Gao T X, Wu S F *et al*, 2007. Pleistocene isolation in the Northwest Pacific marginal seas and limited dispersal in marine fish, *Chelon haematocheilus* (Temminck & Schlegel, 1845). *Molecular Ecology*, 16: 275—288
- Mathews L M, 2007. Evidence for restricted gene flow over small spatial scales in a marine snapping shrimp *Alpheus angulosus*. *Mar Biol*, 152: 645—655
- Millar C L, Libby W J, 1991. Strategies for conserving clinal, Ccotypic, Anadisjunct population diversity in widespread species. In: Fald D A, Holsinger K E ed. *Genetics and Conservation of Rare Plants*. New York: Oxford University Press, 149—170
- Palumbi S R, 2003. Population genetics, demographic connectivity, and the design of marine reserves. *Ecological Applications*, Supplement, 13(1): 146—158
- Pfeiler E, Hurtado L A, Knowles L L *et al*, 2005. Population genetics of the swimming crab *Callinectes bellicosus* (Brachyura: Portunidae) from the eastern Pacific Ocean. *Marine Biology*, 146: 559—569
- Riginos C, Victor B C, 2001. Larval spatial distributions and other early life-history characteristics predict genetic differentiation in eastern Pacific blennioid fishes. *Proceedings of the Royal Society, London*, 268: 1931—1936
- Rozas J, Sanche-delBarrio J C, Messenguer X *et al*, 2003. DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*, 19: 2496—2497
- Stabile J, Waldman J R, Parauka F *et al*, 1996. Stock structure and homing fidelity in Gulf of Mexico Sturgeon (*Acipenser oxyrinchus desotoi*) based on restriction fragment length polymorphism and sequence analysis of mitochondrial DNA.

Genetics, 144: 767—775

Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F *et al*, 1997. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res*,

25: 4876—4882

Ward R D, Woodwark M, Skibinski D F, 1994. A comparison of genetic diversity levels in marine, freshwater, and anadromous fishes. *Journal of Fish Biology*, 44: 213—232

## GENETIC VARIATION IN DIFFERENT POPULATIONS OF *OCTOPUS VARIABILIS* IN CHINA COASTAL WATERS BASED ON THE COI GENE ANALYSIS

CHANG Kang-Mei, LI Huan, Lü Zhen-Ming, CHI Chang-Feng

(*Marine Science College of Zhejiang Ocean University, Key Laboratory of Zhejiang Provincial Marine Culturing Equipments and Engineering Technology, Zhoushan, 316004*)

**Abstract** In this paper, genetic variation of seven populations of *Octopus variabilis* in China coastal waters were investigated by applying mitochondrial gene sequencing technology. Results showed that, compared with other cephalopod species, *O. variabilis* showed higher genetic diversity. Seventy-four polymorphic sites were detected in 635bp aligned sequence, which represented for 11.7% of the total length of the sequenced COI gene. Twenty-five haplotypes were detected out of 108 individuals from these seven populations. The haplotype diversity ( $H$ ), the mean nucleotide diversity ( $Pi$ ) and the average number of nucleotide differences ( $K$ ) reached 0.342—0.934, 0.0008—0.0055 and 0.483—3.495, respectively. Molecular variance analysis revealed a strong genetic structure in these *O. variabilis* populations ( $P>0.05$ ). A pattern of genetic-isolation-by-distance, conforming to the Stepping Stone Model, was detected when  $Nm$  was plotted against geographic distance. According to the UPGMA phylogenetic tree, these *O. variabilis* populations can be divided into three lineages. One lineage is consisted of the Dalian, the Yantai, the Qingdao, the Lianyungang and the Zhoushan population; the other one of the Wenzhou population; and the third one of the Xiamen population. Among these lineages, 14—59 fixed nucleotide sites and 2 fixed amino acid sites substitute along the gene sequence and coded protein were detected. The  $F_{st}$  between them reached 0.8858 ( $P<0.01$ ), and the  $Nm$  between them turned out to be much lower than 1. The genetic distance among the Xiamen lineage and other two lineages reached 0.086—0.098, indicating that they are different subspecies. The benthic lifestyle of *O. variabilis* and complicated geohistorical factors from pleistocene may influence the genetic differentiation of *O. variabilis*. These findings of genetic variation of *O. variabilis* will contribute to better exploitation and refined management of this precious cephalopod resource along the China coast in future.

**Key words** *Octopus variabilis*, COI, Genetic variation