

养殖对曼氏无针乌贼(*Sepiella maindroni*) 群体遗传多样性的影响*

宋微微^{1,2} 王春琳^{1,2}

(1. 宁波大学生命科学与生物工程学院 宁波 315211; 2. 应用海洋生物技术教育部重点实验室 宁波 315211)

提要 采用 24 条随机引物对曼氏无针乌贼 1 个野生群体和 5 代养殖群体共 120 个个体(每个群体 20 个个体)进行了 RAPD 群体遗传多样性分析, 共扩增出 119 个位点, 片段大小为 400—2800bp, 平均每条引物的扩增带数为 4.96 条。各群体的多态位点数 19—24 个不等, 多态位点比例为 13.33%—20.16%, Shannon 指数为 0.0768—0.1018。6 个群体的平均杂合度为 0.0825—0.1231, 期望杂合度为 0.1325—0.1524, 平均杂合子偏离指数均为负值, 表明存在杂合子缺失的现象。乌贼 6 个群体遗传分化系数 F_{ST} 值在 0.0188—0.2436, 其中最大出现在野生群体和第 5 代养殖群体之间。表明 6 个群体间遗传分化已基本处于遗传分化中等的范围内, 而野生群体和第 5 代养殖群体之间已接近中等分化的底线。分子方差分析(AMOVA)结果表明, 6 个群体的遗传变异中有 29.34% 是由不同群体间的基因差异造成的。而如果将养殖后的 5 代群体作为一个总的群体, 养殖群体内部有 19.38% 是由群体间的差异造成的。由此可见, 养殖后的曼氏无针乌贼群体相比野生群体多样性指数有所降低, 且随着养殖时间的增长养殖群体内部开始出现分化。

关键词 曼氏无针乌贼, 群体, RAPD, 遗传分化

中图分类号 S959.216

曼氏无针乌贼(*Sepiella maindroni*)俗称墨鱼、墨斗鱼、海猫等, 其干品又称螟脯鲞。曼氏无针乌贼隶属头足纲、二鳃亚纲、十腕目、乌贼科。乌贼全身是宝, 不但肉可食用, 有活血化瘀的功效, 而且乌贼骨可调节胃酸分泌、止血; 乌贼内脏油含有大量的不饱和脂肪酸, 是良好的饲料添加剂和强化剂; 乌贼墨对功能性子宫出血、肺结核咯血等出血性疾病有止血作用; 同时新近发现乌贼墨还具有抗肿瘤的作用; 乌贼骨与鸵鸟骨可作为组织工程骨的支架材料(董正之, 1988)。已有学者对头足类的形态学分类、解剖学、胚胎发育学、生态学及渔业资源学进行了大量的基础研究, 但在群体生物学和分子遗传学方面的资料比较匮乏(董正之, 1991, 1993; 吴耀泉等, 1990; 张宝琳等, 1997; 李星颀等, 1986)。随着分子生物学技术迅速

发展, DNA 分子的多态性研究受到人们的普遍重视, 作为遗传分析的重要工具 DNA 序列分析技术已经被广泛的应用到物种鉴定、系统学与进化研究、生物种群遗传结构及遗传变异水平等研究领域。

曼氏无针乌贼由于过度捕捞野生资源已近枯竭, 本实验室于 2004 年突破了曼氏无针乌贼人工养殖的技术瓶颈, 并在随后几年里逐步扩大养殖规模, 目前养殖和放流已经达到中试水平。在人工养殖的过程中发现养殖几代后的曼氏无针乌贼出现白化卵、性早熟和孵化率下降等现象。随着养殖规模的扩大、养殖区域的扩展以及人工放流的开展能够获得更多的乌贼新群体, 通过引入新群体进行杂交这种退化现象有所好转。本研究中采用 RAPD 方法比较野生群体和人工繁育得到的 5 代养殖群体, 通过以多态位点比例、

* 国家自然科学基金资助项目, 40646030 号、40776076 号; 教育部长江学者和创新团队发展计划, IRT0734 号; 教育部重点科研项目, 207045 号; 浙江省重大科技专项资助, 2006C13040 号、2007C1206 号。宋微微, 博士研究生, E-mail: sunny1982@gmail.com

通讯作者: 王春琳, 教授, 博士生导师, E-mail: wangchunlin@nbu.edu.cn

收稿日期: 2008-06-12, 收修改稿日期: 2008-08-02

平均杂合度和遗传分化系数为指标所反映的遗传多样性来评价养殖对曼氏无针乌贼种质资源的影响。比较曼氏无针乌贼野生种群和养殖种群的遗传结构和遗传多样性水平, 分析人工养殖条件下群体遗传多样性的变化, 对于查清曼氏无针乌贼的遗传背景, 促进人工繁育和选育工作的发展都具有重要的意义。

1 材料与方法

1.1 材料

曼氏无针乌贼(*Sepiella maindroni*)一年繁殖两次, 本实验取乌贼样品共 120 只, 分别来自 1 个自然海区的野生群体和通过人工繁殖后得到的 5 代养殖群体。其中, ZP 群体: 2004 年采于舟山海域; YF1 群体: ZP 群体通过人工繁殖后得到的第 1 代养殖群体; YF2 群体: YF1 代群体自交产生的第 2 代养殖群体; YF3 群体: YF2 代群体自交产生的第 3 代养殖群体; YF4 群体: YF3 代群体自交产生的第 4 代养殖群体; YF5 群体: YF4 代群体自交产生的第 5 代养殖群体。

1.2 RAPD 分析

基因组 DNA 的提取参照季维智等(1999)的方法。从 54 个 10bp 随机引物(上海生物工程公司产品)中筛选出适合曼氏无针乌贼基因组 DNA 扩增的引物 24 个。基因组 DNA 在 PCR 仪(德国 Eppendorf 公司)上按如下程序进行扩增: 94 预变性 200s; 94 变性 1min, 36 复性 1min, 72 延伸 2min, 45 个循环; 72 延伸 5min, 4 保存。PCR 产物通过 1.6% 琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色后采用 Gel Doc2000 凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司)紫外光下观察分析。

1.3 数据分析

记录下电泳后清晰的扩增片段, 将这些片段作为基因位点进行分析, 并且假设: (1) 在基因组上被 RAPD 扩增的区域以显性等位基因的形式进行分离; (2) RAPD 座位上的基因符合 Hardy-Weinberg 平衡;

(3) 纯合隐性个体的等位基因是完全一致的(identical in state, *iis*)(即它们来自相同的突变); (4) 显性等位基因, 即扩出的 RAPD 产物也是完全一致的(*iis*)。统计位点数和多态位点数, 计算多态位点比例。用 Popgene 1.32 软件计算每个群体的观察杂合度(H_o)、期望杂合度(H_e)、群体内 Shannon 多样性指数, 通过各位点的基因型频率对 6 个群体进行 Hardy-Weinberg 平衡分析。利用 Arlequin 2.0 软件(Schneider *et al*, 2000)计算分化指数 F_{ST} , 估计群体间的遗传分化, 分析群体内和群体间的分子方差(Analysis of Molecular Variance, AMOVA)(Excoffier *et al*, 1992)。

2 结果

2.1 PCR 扩增的结果

筛选的 24 个 10bp 的寡核苷酸随机引物均得到重复性好且带型清晰的扩增谱带, 但各引物所能扩出的带数以及揭示的多态性各不相同, 其分子量为 400—2800bp, 扩增图谱见图 1。

2.2 遗传结构分析

分别对 6 个曼氏无针乌贼群体 RAPD 结果进行统计, 24 条引物扩增出 119 条清晰可辨的扩增条带, 各群体的多态位点数 14—24 个不等, 多态位点比例为 13.33%—20.16%, Shannon 多样性指数为 0.0768—0.1018(表 1)。野生群体明显高于养殖群体, 养殖群体内部也出现分化, 养殖后第 5 代群体(YF5)各遗传学参数明显低于前 4 代养殖群体。6 个群体的平均杂合度为 0.0825—0.1231, 期望杂合度为 0.1325—0.1524, 平均杂合子偏离指数均为负值, 表明存在杂合子缺失的现象。对于 6 个群体进行 Hardy-Weinberg 检测, 发现群体存在偏离遗传平衡现象。

2.3 遗传分化分析

曼氏无针乌贼 6 个群体间的遗传距离和遗传相似度如表 2 所示, 遗传距离最大值出现在养殖群体和

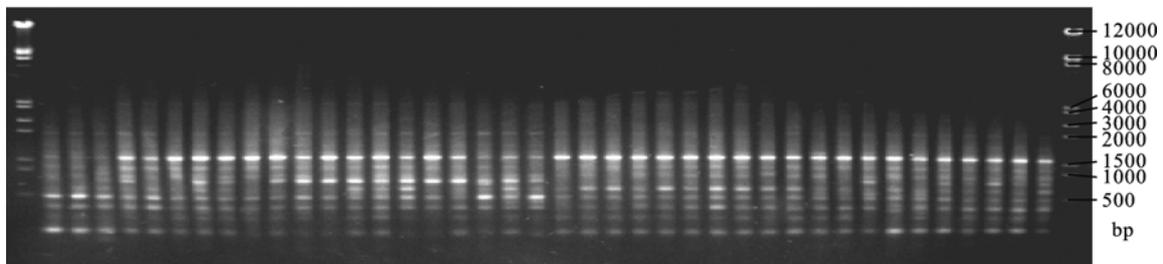


图 1 随机引物 S234 在曼氏无针乌贼 6 个群体的扩增电泳图谱

Fig.1 The amplified profiles of random primer S234 in six populations of *S. maindroni*

表 1 曼氏无针乌贼 6 个群体 RAPD 标记分析结果
Tab.1 Analysis of RAPD markers in the six populations of *S. maindroni*

群体	位点数	多态位点数	多态位点比(%)	平均观察杂合度(H_o)	平均期望杂合度(H_e)	杂合度偏离指数	Shannon 多样性指数
野生 ZP	119	24	20.16	0.1231	0.1436	-0.0205	0.1018
养殖 YF1	116	20	17.24	0.1046	0.1325	-0.0379	0.0894
养殖 YF2	116	19	16.38	0.0983	0.1368	-0.0475	0.0808
养殖 YF3	115	19	16.52	0.1035	0.1402	-0.0367	0.0849
养殖 YF4	112	17	15.17	0.0904	0.1452	-0.0548	0.0812
养殖 YF5	105	14	13.33	0.0825	0.1524	-0.0699	0.0768

野生群体之间, 而养殖后的前 3 代群体间的遗传距离很小, 接近于群体内个体间的遗传距离, 第 4 代开始出现分化, 第 5 代养殖群体与前 4 代间差异显著。对群体间的遗传分化水平进行检测(表 3), 得到固定指数 F_{st} 值 0.0188—0.2436, 显著性检验表明, 各群体之间存在遗传分化差异。其中最大值出现在野生群体和第 5 代养殖群体之间。

如果将 6 个群体看作一个总的群体, 分子方差分析(AMOVA)结果表明(表 4), 总群体的遗传变异中有 29.34% 是由不同群体间的基因差异造成的。而如果将

养殖后的 5 代群体作为一个总的群体, 养殖群体内部有 19.38% 是由群体间的差异造成的。由此可见, 养殖后的曼氏无针乌贼群体而相对于野生群体多样性指数有所降低, 随着养殖时间的增长养殖群体内部开始出现分化。

3 讨论

3.1 曼氏无针乌贼群体的遗传结构

生物群体的遗传变异水平是评估生物资源状况的一个重要标准, 许多研究表明变异水平与生物的

表 2 曼氏无针乌贼 6 个群体的遗传距离(下三角)及遗传相似性指数(上三角)

Tab.2 Genetic distance (below diagonal) and genetic similarity indices (above diagonal) among the six populations of *S. maindroni*

群体	野生 ZP	养殖 YF1	养殖 YF2	养殖 YF3	养殖 YF4	养殖 YF5
野生 ZP	—	0.8821	0.8449	0.8597	0.8322	0.7757
养殖 YF1	0.1179	—	0.9512	0.9371	0.9202	0.8771
养殖 YF2	0.1551	0.0488	—	0.9782	0.9364	0.8335
养殖 YF3	0.1403	0.0629	0.0218	—	0.9628	0.8646
养殖 YF4	0.1678	0.0798	0.0636	0.0382	—	0.8782
养殖 YF5	0.2243	0.1229	0.1665	0.1354	0.1218	—

表 3 曼氏无针乌贼 6 个群体间配对比较的 F_{ST} 值

Tab.3 Pairwise comparison of F_{ST} value among the six populations of *S. maindroni*

群体	野生 ZP	养殖 YF1	养殖 YF2	养殖 YF3	养殖 YF4
养殖 YF1	0.1078	—	—	—	—
养殖 YF2	0.1058	0.0188	—	—	—
养殖 YF3	0.1152	0.0223	0.0234	—	—
养殖 YF4	0.1526	0.1036	0.0765	0.0782	—
养殖 YF5	0.2436	0.1842	0.1765	0.1554	0.1121

表 4 曼氏无针乌贼 6 个群体的分子方差分析

Tab.4 AMOVA of the six populations of *S. maindroni*

变异来源	野生群体和 5 代养殖群体的比较			5 代养殖群体比较		
	群体间	群体内	总和	群体间	群体内	总和
自由度 df	5	114	119	4	94	99
平方和	3562.356	15682.258	19244.614	2851.436	13412.189	19244.614
方差组成	12.5653	30.2029	42.7682	10.3625	43.1075	53.4700
变异百分比	29.34	70.66	100	19.38	80.62	100

生长速度和抗病能力等生产性状密切相关。本研究运用 RAPD 技术分析曼氏无针乌贼养殖群体和野生群体的遗传多样性。结果表明, 24 个 RAPD 引物野生群体共扩增 119 条, 平均每个引物扩增出 4.96 条, 其中 24 条代表为多态, 多态比例为 20.16%; 养殖群体扩增出条带数 105—116 条, 其中 14—20 条带表现为多态, 多态比例为 13.33%—17.24%, 6 个群体的平均杂合度为 0.0825—0.1231, 期望杂合度为 0.1325—0.1524, 平均杂合子偏离指数均为负值, 表明存在杂合子缺失的现象。杂合子缺失的现象也在其它的物种中被发现(Fujio *et al.*, 1989; Gaffney *et al.*, 1990; Zouros *et al.*, 1984)杂合子缺失会导致纯合子增加, 近交衰退几率增加, 从而降低物种适应环境变化的能力。本研究中各个群体近交效应应该是造成杂合子缺失的主要原因, 对于 6 个群体进行 Hardy-Weinberg 检测发现群体存在偏离遗传平衡现象。

已有研究报道多种水产经济动物养殖和野生群体的比较, 如 Alcivar 等(1997)在高健康(HHS)和无特异病原(SPF)凡纳滨对虾的培育中, 用 RAPD 技术对凡纳滨对虾的野生种群以及不同家系进行检测和分析, 发现其多态位点比例约为 50%, 其中一个家系的多态位点比例高达 77%。宋林生等(1999)研究了日本对虾野生和养殖种群的遗传结构, 得出野生种群的多态位点比例和平均杂合度为 54.14%和 0.2517, 明显比养殖种群的 37.91%和 0.1343 要高; 中国对虾黄渤海沿岸群的遗传距离为 0.0941。李明云等(2004)罗氏沼虾养殖群体多态位点比例为 30.22%, 遗传距离为 0.0647; 野生群体的多态位点比例为 33.81%, 群体遗传距离为 0.0799, 两群体的遗传距离为 0.1845, 野生群体的遗传多样性水平比养殖群体要高。于红等(2007)应用微卫星标记技术研究 5 个中国太平洋牡蛎养殖群体和 2 个日本太平洋牡蛎野生群体的遗传变异, 发现养殖群体和野生群体存在显著差异, 养殖群体内部也发生了明显的分化。

对比上述报道和本研究结果可以看出曼氏无针乌贼群体的遗传多样性偏低, 且养殖前后遗传参数变化较大。除了近交效应外, 与头足类本身遗传变异率较低有关。由于过度的捕捞可能引起种群的衰退, 特别对那些由较少个体组成的种群影响更大。大多数头足类, 特别是那些经济性种类一年生, 没有世代重叠。它们的遗传多样性, 尤其遭到过度捕捞而且又被过高的估计了逃逸率的情况下, 受瓶颈效应的作用相当显著。就种群而言, 有可能造成资源衰竭, 物种

灭绝, 遗传变异率很低也不可避免(Romero *et al.*, 1981)。Nevo(1978)对众多海洋生物遗传多样性研究后指出, 许多海洋物种具有低水平的多态性, 特别是那些生活在极地水域的种类杂合度偏低, 这个结论在其它的研究中得到了一定程度的支持(Carvalho *et al.*, 1989; Perez *et al.*, 1996)。

3.2 曼氏无针乌贼野生与养殖后群体的分化

曼氏无针乌贼 6 个群体间遗传距离最大值出现在养殖群体和野生群体之间, 而养殖后的前 3 代群体间的遗传距离很小, 接近于群体内个体间的遗传距离, 第 4 代开始出现分化, 第 5 代养殖群体与前 4 代间差异显著。野生与养殖比较, 人工养殖后群体遗传多样性有所下降, 可能与人工养殖水体单一, 饵料生物品种相同等有关。遗传多样性的减少很可能影响繁殖和生长, 庄志猛(2001)对野生和养殖对虾群体进行了遗传多样性研究, 认为尽管来自野生亲本的一代养殖群体的遗传多样性改变不多, 但人工累代繁殖体系会导致后代基因库发生不良变化, 从而引起群体生长缓慢、抗逆性差等后果。童馨等(2009)采用微卫星位点对凡纳滨对虾的海南 4 个世代 7 个养殖群体的遗传多样性分析, 发现不同世代间遗传变异大, 随着繁育世代的增加, 遗传多样性降低。

Wright(1978)认为 F_{ST} 在 0—0.05 表示群体间遗传分化微弱, 0.05—0.15 表示群体遗传分化中等, 0.15—0.25 表示群体遗传分化较大, 当 F_{ST} 大于 0.25 时表示遗传分化极大。遗传分化系数和显著性分析结果表明曼氏无针乌贼 6 个群体差异主要来源于野生群体和养殖群体之间, 以及第 5 代野生群体和前 4 代养殖群体之间。乌贼 6 个群体中两两比对的 F_{ST} 值为 0.0188—0.2436, 其中最大出现在野生群体和第 5 代养殖群体之间。表明 6 个群体间遗传分化已基本处于遗传分化中等的范围内, 而野生群体和第 5 代养殖群体之间已接近中等分化的底线。将 6 个群体看作一个总的群体, 分子方差分析(AMOVA)结果表明, 总群体的遗传变异中有 29.34%是由不同群体间的基因差异造成的。而将养殖后的 5 代群体作为一个总的群体, 养殖群体内部有 19.38%是由群体间的差异造成的。

综上所述, 养殖后的曼氏无针乌贼群体相比野生群体多样性指数有所降低, 随着养殖时间的增长养殖群体内部开始出现分化。因为养殖后群体伴随人工选育过程会有近交几率增加、有效群体数不断减少等情况发生, 进而导致遗传变异程度降低和遗传多样性相应减少。同时, 较短的生活史造成的瓶颈效应

及缺乏随机漂变也是头足类遗传变异较低的主要原因,但如果能够有效控制群体的选育仍然可以使其健康发展,可借鉴中国对虾人工选育的研究结果在选育过程中采取了一定的措施。首先,留取了足够数目的亲虾;其次,在收集虾卵时分批次进行而不是集中采集因为虾类是高生殖力的生物,这样可以避免由于产卵时间的不同步性而造成的实际有效亲本数量太少;另外,严格控制交尾,选留后代覆盖面广,这些措施都有助于保持有效亲本数量,是育种过程中避免近交衰退的有效手段(张天时等,2005)。

由于曼氏无针乌贼的养殖群体开始遗传分化,而且头足类本身的遗传多样性水平偏低,在今后的工作中要继续对其种群的遗传多样性进行检测,判断各种人为和环境因素对其遗传多样性变化的影响。建议养殖过程中一定要考虑引进曼氏无针乌贼的亲本数量及其多样性,采取隔离养殖保种,避免近亲繁殖,进而有效控制曼氏无针乌贼的群体分化,从而保证曼氏无针乌贼养殖业的健康持续发展。

参 考 文 献

- 于红,李琪,2007.太平洋牡蛎养殖与野生群体遗传变异的微卫星研究.遗传学报,34(12):1114—1122
- 庄志猛,2001.日本对虾野生和养殖群体遗传多样性的RAPD分析.自然科学进展,11(3):250—255
- 李星云,张海琪,朱俊杰等,2004.罗氏沼虾浙江养殖群体与缅甸自然群体遗传变异的RAPD分析.水产学报,28(4):360—363
- 李星颀,唐逸民,戴健寿等,1986.乌贼资源增殖及繁殖保护研究专辑.浙江水产学院学报,5(2):99—193
- 吴耀泉,唐质灿,1990.黄河口及莱州湾哈曼氏无针乌贼的群体组成和洄游分布.水产学报,14(2):149—152
- 宋林生,相建海,1999.日本对虾野生种群和养殖种群遗传结构的RAPD标记研究.海洋与湖沼,30(3):261—266
- 张天时,王清印,刘萍等,2005.中国对虾(*Fennero penaeus chinensis*)人工选育群体不同世代的微卫星分析.海洋与湖沼,36(1):72—80
- 张宝琳,孙道元,毕洪生等,1997.胶州湾及邻近水域曼氏无针乌贼的生长和季节分布.海洋科学,5:61—64
- 季维智,宿宾,1999.遗传多样性研究的原理和方法.杭州:浙江科学技术出版社,212—222
- 董正之,1988.中国动物志,软体动物门,头足纲.北京:科学出版社,1—201
- 董正之,1991.世界大洋经济头足类生物学.济南:山东科学技术出版社,1—275
- 董正之,1993.头足类研究.中国海洋科学研究及开发.青岛:青岛出版社,23—36
- 童馨,裘世圆,喻达辉等,2009.凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)不同世代养殖群体的遗传多样性分析.海洋与湖沼,40(2):214—220
- Alcivar W A, Overstreet R M, Dhar A K *et al*, 1997. Genetic susceptibility of cultured shrimp (*Penaeus vannamei*) to infection hypodermal and hematopoietic necrosis virus and *Baculovirus penaei*: possible relationship with growth and metabolic gene expression. *Invertebr Pathol*, 70(3): 190—197
- Carvalho G R, Thompson A, Stoner A L, 1989. Genetic diversity and population differentiation of the shortfin squid *Illex argentinus* in the south-west Atlantic. *Exp Biol Ecol*, 126: 231—241
- Excoffier L, Smouse P E, Quattro J M, 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: applications to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 13(3): 476—479
- Fujio Y, Oniwa K, Yuzawa A *et al*, 1989. Genetic variability and population structure in abalone. *Japan Fisheries Resource Conversation Association*, Tokyo, 459—476
- Gaffney P M, Scott T M, Koehn R K *et al*, 1990. Interrelationships of heterozygosity, growth rate and heterozygote deficiencies in the coot clam, *Mulinia lateralis*. *Genetics*, 124(1): 678—699
- Nevo E, 1978. Genetic variation in natural populations: patterns and theory. *Theoretical Population Biol*, 13: 121—177
- Patricia D, Pedro M G J, 2005. Assessment of the genetic diversity in five generations of a commercial broodstock line *Litopenaeus vannamei* shrimp. *African J Biotechnol*, 4(12): 1362—1367
- Perez L M, Guerra A, Sanjuan A, 1996. Allozyme electrophoretic technique and phylogenetic relationships in three species of *Sepia* (Cephalopoda: Sepiidae). *Comp Bioc Physiol B*, 114: 11—18
- Romero M C L, Amaratunga T, 1981. Preliminary results of a biochemical genetic population structure study of the squid, *Illex illecebrosus*. *Nafo Scr Doc*, 405(5): 103
- Schneider S, Roessli D, Excoffier L, 2000. *Arelequin* Version: A Software for Population Genetics Data Analysis. *Genetics and Biometry Laboratory University of Geneva, Switzerland*, 2—45
- Wright S, 1978. *Evolution and the genetics of populations*. University of Chicago Press: 203—210

GENETIC DIVERSITY OF *SEPIELLA MAINDRONI* IN CULTURED AND NATURAL POPULATIONS

SONG Wei-Wei^{1,2}, WANG Chun-Lin^{1,2}

(1. Faculty of Life Science and Biotechnology, Ningbo University, Ningbo, 315211;

2. Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology, Ministry of Education, Ningbo, 315211)

Abstract Genetic diversity of six *Sepiella maindroni* stocks (20 individuals from each stock) was investigated by using 24 random RAPD primers. A total of 119 RAPD bands ranging from 400bp to 2800bp were recorded with an average of 4.96 bands gained per primer. The mean percentages of polymorphic loci of *S. maindroni* stocks range from 19 to 24, the proportion of polymorphic loci is 13.33% to 20.16% and the Shannon index range from 0.0768 to 0.1018. The mean value of D (heterozygote deficiency of excess) is negative, indicating the overall deficit in heterozygote for the six stocks. The genetic differentiation index F_{ST} values range from 0.0188 to 0.2436, and the most significantly diversity is between natural stock and the fifth generations of cultured stock. The results of genetic differentiation and significance analysis show that the most difference of diversity among the six stocks were from the diversity between the natural stock and cultured stocks. AMOVA results indicate that the genetic variation among stocks (29.34%) is lower than within (70.66%). If taking the five cultured stocks as a whole stock, the genetic variation among stocks (19.38%) is lower than within (80.62%). Therefore, the genetic difference between natural stock and cultured stocks has been obvious, and the diversity within the generations of cultured stocks tended to decrease especially in the fifth generation.

Key words *Sepiella maindroni*, Population, RAPD, Genetic differentiation