

短蛸(*Octopus ocellatus*)四个地理群体 遗传特性的 AFLP 分析*

张龙岗^{1,2} 杨建敏¹ 刘相全¹ 王卫军¹
孙国华¹ 刘丽娟¹ 郑小东³

(1. 山东省海洋水产研究所 烟台 264006; 2. 上海海洋大学 上海 201306;
3. 中国海洋大学 青岛 266003)

提要 应用 AFLP 标记技术对我国北方近海短蛸的遗传多样性进行分析。采用 6 对 AFLP 引物组合对 4 个群体(大连、烟台、青岛、连云港)120 个个体进行扩增,其中每对引物扩增位点数在 42—66 之间,共得到 303 个扩增位点。4 个群体内的多态位点比例为 62.03%—67.93%。群体的 Nei's 基因多样性指数(H)为 0.2353—0.2617, Shannon 多样性指数(I)为 0.3497—0.3863, 群体间的遗传距离为 0.0497—0.085; 大连群体的多态位点比例、Shannon 多样性指数和群体 Nei's 基因多样性指数均高于其它三个群体。用 UPGMA 方法构建的群体系统进化树显示,大连群体与烟台群体聚到一起,青岛群体与连云港群体聚到一起,显示群体间具有典型的地理特征,但群体间存在遗传渗透。分子变异分析(AMOVA)结果表明,短蛸群体 88.28% 的变异来源于群体内,群体间的变异占 11.72%,显示短蛸的遗传变异主要来源于群体内个体间,但群体间已经有了一定程度的遗传分化。

关键词 短蛸, AFLP 分析, 遗传多样性

中图分类号 Q953

短蛸(*Octopus ocellatus*)又称短脚蛸、饭蛸、岩章等,我国南北沿海均有分布,黄、渤海产量较大,在山东的青岛、烟台、威海,辽宁的大连、营口,河北的乐亭产量较多,是我国北部沿海蛸类中最重要的经济种之一(董正之, 1988)。近年来,由于捕捞强度的加大和消费需求的增加,其自然资源严重衰减。了解短蛸的遗传结构和种质资源状况,对目前开展的人工繁育及资源保护有着重要意义。

当前有关短蛸的研究多限于对其形态学(董正之, 1988; 郑小东等, 2006)、生活习性(魏臻邦, 1996; 黄美珍, 2004)、繁殖生物学等(张学舒, 2002; 北岛力等, 1985)的研究,而有关群体遗传多样性研究也仅见高强等(2002)利用同工酶技术的研究报道,目前尚未见 AFLP 标记技术在短蛸遗传多样性、分类及进化等方

面的研究报道。由于同工酶检测的是基因表达后的产物,会受到生物发育阶段及环境条件等诸多因素的影响,而且所反映的遗传信息量较少,容易造成实验数据的偏离。为得到高信息量的遗传信息数据以更加准确地了解短蛸的遗传结构状况,本研究采用更加灵敏的扩增片段长度多态性(AFLP)技术,从 DNA 水平上对我国北方近海短蛸的遗传变异进行分析,为开展短蛸人工繁育和资源保护提供遗传背景资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本实验共采集了大连、烟台、青岛和连云港四个不同地理群体的短蛸(*Octopus ocellatus*)样本。每个群体随机抽取了 30 个个体作为研究对象。样品运回实

* 山东省优秀中青年科学家奖励基金(博士基金)资助, 2006BS06010 号, 山东省科技攻关项目资助, 2006GG2205028 号; 国家“863”计划“中国近海贝类资源的采集、保存与信息化技术”, 2007AA09Z433 号。张龙岗, E-mail: zlg-0302@163.com

通讯作者: 杨建敏, 博士, 研究员, E-mail: ladderup@126.com

收稿日期: 2009-06-23, 收修改稿日期: 2009-08-18

实验室后首先测量基本生物学性状,然后解剖取样,置-80℃中保存。样品的采集情况见表1。

表1 中国北方沿海短蛸居群、采集地点、时间以及样品数量和体重

Tab.1 The population, sample location, quantity, date, and weight of *O. ocellatus* collected in northern China coastal waters

居群	代码	数量(个)	时间(年.月.日)	平均体重±标准差(g)
大连	DL	30	2008.04.27	78.03±2.34
烟台	YT	30	2007.12.16	83.34±2.28
青岛	QD	30	2008.01.12	77.41±2.37
连云港	LY	30	2007.11.25	79.04±2.35

1.2 基因组DNA提取及检测

取冷冻样品约200mg,低温下研磨为糊状,采用CTAB法(Boulding, 1993)并稍加改进,提取总DNA。1%的琼脂糖凝胶电泳检测DNA,凝胶成相系统观察、照相,选择纯度较好的DNA稀释到100ng/μl, -20℃下保存用于AFLP实验。

1.3 AFLP分析

AFLP操作流程参照Vos等(1995)的方法并略加改动。所用限制酶、接头和引物等均购自上海生工生物技术服务公司,用于本实验的接头和引物序列如表2所示。PCR扩增使用PE9600 PCR仪。内切酶为EcoR I和Mse I,预扩增引物含1个选择碱基,即E00+A, M00+C,预扩增产物稀释20倍后用6对含3个选择碱基的选择性扩增引物进行扩增。扩增产物在6%的变性聚丙烯酰胺凝胶上电泳分离,银染后统计条带。

表2 用于AFLP分析的接头和引物序列

Tab.2 Adaptor and primer sequences used for AFLP analysis

引物/接头	序列组成
Mse I adaptor	5'-GACGATGAGTCCTGAG-3' 3'-TACTCAGGACTCAT-5'
EcoR I adaptor	5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3' 3'-CTGACGCATGGTTAA-5'
E00(通用引物)	5'-GACTGCGTACCAATTC-3'
M00(通用引物)	3'-GATGAGTCCTGAGTAA-5'

1.4 数据整理与分析

利用分析软件Cross Checker version 2.91(Buntjier, 1999)进行谱带识别和分析,电泳图谱中有条带记为“1”,无条带记为“0”,获得0、1矩阵。用POPGENE1.32软件计算出等位基因数、Shannon多样性指数(I)、Nei's基因多样性指数(H)、Nei's遗传距离(D) (Nei, 1979),用Arlequin 3.0 (Excofier *et al.*, 2005)进行AMOVA分析并估算群体间遗传分化系数

(F_{st})。根据个体间遗传距离矩阵,采用PHYLIP 3.62 (Felsenstein, 2002)软件以UPGMA方法对群体进行聚类分析。

2 结果与分析

2.1 短蛸群体AFLP扩增谱带统计

应用6对选择性引物组合从4个群体中扩增得到303个位点,结果如表3所示。每个引物组合扩增的位点数在42—66之间,平均扩增位点50.5个。其中引物E00+ACA/M00+CTG得到49个, E00+AGT/M00+CGT得到51个, E00+AGA/M00+CCT得到48个, E00+ATC/M00+CCT得到66个, E00+AAG/M00+CGA得到47个, E00+AGA/M00+CCT得到42个,总的多态位点170个,平均每个引物组合扩增出多态性位点数目为28.3个。4个群体的多态位点比例达到86.08%。4个群体内的多态位点比例为62.03%—67.93%。

2.2 群体遗传多样性及群体遗传分化分析

四个群体内的Nei's基因多样性指数和Shannon多样性指数如表4所示,在这四个群体中,大连群体(DL)和连云港群体(LY)的多态位点比例最大,分别为67.93%和64.56%,其次是烟台群体(YT),为62.87%,青岛群体(QD)多态位点比例最小,为62.03%;从基因多样性水平来看,大连群体(0.2617)最大,其次是连云港群体(0.2482),再次为青岛群体(0.2389),烟台群体的最小(0.2353);群体内的Shannon多样性指数和Nei's基因多样性指数变化趋势相同,大连群体最大(0.3863),其次是连云港(0.3675),再次是青岛(0.3530),最小为烟台(0.3497)。大连群体无论在多态位点比例、Shannon多样性指数还是Nei's基因多样性指数等参数上与其它群体相比都较大。

应用分子方差分析(AMOVA)对4个群体的遗传变异来源进行分析,如表5所示。结果表明短蛸4个

表3 不同引物的扩增结果

Tab.3 Number of bands generated by primer combinations

引物组合	总扩增位点数	总多态位点数	多态位点比例 P(%)
E00+AAG/M00+CGA	47	24	51.06
E00+ACA/M00+CTG	49	31	63.27
E00+AGA/M00+CCT	48	26	54.17
E00+AGT/M00+CGT	51	27	52.94
E00+ACT/M00+CGA	42	25	59.52
E00+ATC/M00+CCT	66	37	56.06

表 4 短蛸 4 个群体的遗传结构
Tab.4 Summary of genetic diversity of four *O. ocellatus* populations

群体	多态位点比例 $P(\%)$	Nei's 基因多样性指数 H	Shannon 多样性指数 I
大连群体(DL)	67.93	0.2617	0.3863
烟台群体(YT)	62.87	0.2353	0.3497
青岛群体(QD)	62.03	0.2389	0.3530
连云港群体(LY)	64.56	0.2482	0.3675

群体在 6 对 AFLP 引物位点的检测下, 其群体间的遗传分化系数 $F_{st} = 0.1172$, 即群体间的遗传变异占 11.72%, 而 88.28% 的变异来源于群体内, 说明短蛸四个群体之间的变异较小, 变异主要来自于群体内个体间。作者推测, 虽然群体间有一定的基因交流, 但是短蛸 4 个群体之间已经有了一定程度的遗传分化。

2.3 遗传距离及聚类分析

短蛸四个居群间的遗传距离见表 6(对角线之下)。表 6 中数据显示, 中国北部沿海短蛸四个居群间的遗传距离在 0.0497—0.0851 之间, 大连和烟台两个地理位置最近的居群间的遗传距离最小。而大连和青岛两个居群间的遗传距离最大, 为 0.0851, 这与地理位置的远近稍有差异。

表 5 短蛸各自然群体间遗传差异的分子方差分析表 (AMOVA)

Tab.5 Analysis of molecular variance (AMOVA) among populations of *O. ocellatus*

变异来源	自由度 df	平方和	方差组分	方差比例(%)
群体间	3	427.108	3.7935	11.72
群体内	116	3313.638	28.5658	88.28
总变异	119	3740.742	32.3593	

表 6 各群体之间遗传相似度(对角线之上)及遗传距离(对角线之下)

Tab.6 Nei's genetic identity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal)

群体	DL	QD	YT	LY
DL	—	0.9184	0.9515	0.9238
QD	0.0851	—	0.9358	0.9335
YT	0.0497	0.0663	—	0.9319
LY	0.0793	0.0689	0.0705	—

根据 6 对引物的扩增结果和群体间遗传距离矩阵, 用 PHYLIP 3.62 软件以 UPGMA 方法对四个群体进行聚类, 聚类结果(图 1)可以看出, 连云港群体与青岛群体聚到一起, 大连群体与烟台群体聚到一起, 显示各群体间具有典型的地理特征。

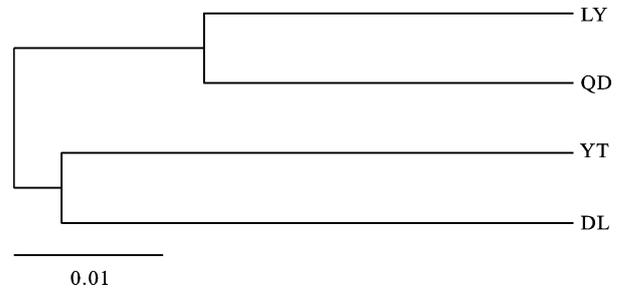


图 1 短蛸 4 个群体的 UPGMA 聚类图

Fig.1 Dendrogram of four *O. ocellatus* populations by UPGMA method based on Nei's genetic distance

3 讨论

遗传多样性主要是指物种内的不同种群间以及种群内不同个体之间的遗传变异, 是生物进化的内在源泉, 与物种的繁衍或濒危灭绝有密切的关系。遗传多样性在一定程度上决定了物种的分布以及数量多样性(陈灵芝等, 2001)。本研究采用 AFLP 方法对短蛸四个群体的遗传多样性进行了分析, 6 对引物共扩增出 303 个位点, 平均每个引物组合扩增出多态性位点数目为 28.3 个。四个群体内的多态位点比例为 62.03%—67.93%, 明显高于高强等(2002)采用同工酶方法对五个短蛸自然群体遗传多样性研究结果, 表明 AFLP 技术可以产生丰富的多态性条带, 获得的遗传信息丰度要远远高于同工酶技术, 检测效率更高。

从遗传多样性的分布来看, 通过对群体的 Shannon 多样性指数和群体间遗传差异的分子方差分析, 表明短蛸四个群体的遗传变异主要来自于群体内个体间。根井正利(1975)利用遗传距离 D 值对物种的不同分类单位间的遗传变异水平作过定量性估计, 并指出种群间遗传距离 D 值的范围是 0—0.05, 亚种间是 0.02—0.2; Wright(1951)对遗传分化系数的大小与分化程度的关系的规定, 分化系数在 0.05—0.15 之间, 表示群体之间出现中等分化。本研究所得四个地理群体的遗传距离为 0.0497—0.0851 之间, AMOVA 分析结果表明, 遗传分化指数 $F_{st} = 0.1172$, 因此, 可以推测短蛸四个群体间已经有了一定程度的遗传分化。作

者认为这主要与短蛸生活习性有关,短蛸属于浅海底栖种类,栖息场所多为岩礁、珊瑚礁、藻场等,活动范围相比洄游种类的水产动物要小,因此,在长期的进化中逐渐形成了遗传信息的地理隔离,导致群体间出现了一定程度的遗传分化。

从遗传距离和群体聚类上来看,中国北方近海短蛸4个地理群体间的遗传距离在0.0497—0.0851之间,四个群体明显聚为两支,一支是大连和烟台群体,另一支是青岛和连云港群体,群体间表现出典型的地理特征。作者推测这可能是由于山东半岛地理特征的影响,烟台和大连位于黄海北部,距离较近,而与南部的青岛和连云港之间被山东半岛所阻隔,所以在聚类图上表现出明显的两个分支。

遗传多样性是进化和适应的基础,种内遗传多样性或变异性愈丰富,物种对环境变化的适应能力愈大,其进化的潜力也就愈大,有助于保持物种和整个生态系统的多样性,或可以减慢由于适应和进化所导致的灭绝过程(施立明,1990)。从本研究结果来看,四个短蛸群体均具有中等的遗传多样性,群体间存在较弱的遗传变异,变异主要来源于群体内个体间。短蛸寿命较短,一般12—18个月,繁殖高峰一般在4—5月份,据此,人们应保护其栖息地及继续实行休渔期制度,有计划地实施捕捞以保持其进化潜力和可持续利用。

参 考 文 献

- 张学舒, 2002. 人工环境中短蛸的繁殖行为和胚胎发生. 浙江海洋学院学报, 21(3): 220—224
- 陈灵芝, 马克平, 2001. 生物多样性科学: 原理与实践. 上海: 上海科学技术出版社, 93—123
- 郑小东, 王如才, 2006. 中国沿海九种头足类齿舌的形态学. 水产学报, 26(5): 417—421
- 施立明, 1990. 遗传多样性及其保护. 生物科学信息, (2): 158—164
- 高 强, 王昭萍, 王如才等, 2002. 五个短蛸群体等位基因酶的遗传变异. 海洋湖沼通报, (4): 46—51
- 黄美珍, 2004. 台湾海峡及邻近海域4种头足类的食性和营养级研究. 台湾海峡, 23(3): 331—340
- 董正之, 1988. 中国动物志软体动物门头足纲. 北京: 科学出版社, 174—176
- 魏臻邦, 1996. 短蛸生活习性的初步观察. 动物学杂志, (1): 26—28
- 根井正利著, 王家玉译, 1975. 分子群体遗传学与进化论. 北京: 农业出版社, 121—133
- 北岛力, 林田豪介, 1985. 短蛸的孵化饲养. 水产增殖, 32(4): 220—224
- Boulding E G, 1993. Genetic variation in bottlenecked and two wild populations of the Japanese scallop (*Patinopecten yessoensis*): empirical parameter estimates from coding regions of mitochondrial DNA. Can Fish Aquat Sci, 50: 1147—1157
- Buntjier J B, 1999. Cross Checker version 2.91[EB/OL]. [http://www.spg.wau.nl/pv/pub/Cross Check](http://www.spg.wau.nl/pv/pub/Cross%20Check)
- Excofier L, Laval G, Schneider S, 2005. Arlequin ver.3.01: an integrated software package for population genetics data analysis. Evol Bioinform Online, 1: 47—50
- Felsenstein J, 2002. PHYLIP Version 3.62 [EB/OL]. <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>
- Nei M, Li W H, 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proc Natl Acad Sci, 76(10): 5269—5273
- Vos P, Hogers R, Bleeder M *et al*, 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Research, 23: 4407—4414
- Wright S, 1951. The genetical structure of populations. Annals of Eugenics, 15: 323—334

THE GENETIC DIVERSITY OF *OCTOPUS OCELLATUS* BY AFLP MARKERS

ZHANG Long-Gang^{1,2}, YANG Jian-Min¹, LIU Xiang-Quan¹, WANG Wei-Jun¹,
SUN Guo-Hua¹, LIU Li-Juan¹, ZHENG Xiao-Dong³

(1. Shandong Marine Fisheries Research Institute, Yantai, 264006; 2. Shanghai Ocean University, Shanghai, 201306;
3. Ocean University of China, Qingdao, 266003)

Abstract Amplified fragment length polymorphism (AFLP) was applied to assess the genetic variation among four populations of *Octopus ocellatus*, the four populations included Dalian (DL), Qingdao (QD), Yantai (YT), and Lianyungang (LY). A total of 303 reproducible bands amplified with 6 AFLP primer combinations were obtained from 120 individuals. The percentage of polymorphic loci ranges from 62.03% to 67.93% within the four populations. The Nei's gene diversity (H) of the four populations are 0.2353—0.2617. The Shannon diversity indices (I) are 0.3497—0.3863, and the genetic distances (D) are 0.0497—0.085 among populations. The percentage of polymorphic loci (P), Shannon diversity index, genetic distance for the population DL is the highest among the four populations. The four populations are clustered into two major clades by UPGMA method based on genetic distance. Populations of DL and YT are clustered into one clade, QD and LY are clustered into the second clade, showing typical geographical features among the four groups. Although the four populations are grouped into two clusters by whole population, all the 120 individuals from four populations are not clustered with each other. AMOVA analysis indicates that 11.72% of variance is inter-populations and 88.28% of variance is intra-populations, showing the genetic variation occurred mainly within groups; however, certain degree of genetic differentiation took place among groups.

Key words *Octopus ocellatus*, AFLP analysis, Genetic diversity