

长蛸(*Octopus variabilis*)不同地理群体 遗传多样性的 ISSR 分析*

郭宝英 周超 吕振明 李继姬 吴常文

(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 舟山 316004)

提要 利用 ISSR 分子标记技术获得长蛸的 ISSR-PCR 最优反应体系,并对大连、烟台、青岛、连云港、舟山、温州、厦门 7 个群体 168 个个体进行遗传多样性分析。结果表明,7 个引物在 7 个群体中共扩增出 118 条重复性好且带型清晰的 ISSR 扩增带,其中多态条带为 55 条,多态性比例达 46.61%。在物种水平上的 Nei's 基因多样性指数和 Shannon's 信息指数分别为 0.3145 和 0.4766,在群体水平上分别为 0.1573 和 0.2355。7 个群体可明显聚类为 2 个类群,AMOVA 分子变异分析发现,长蛸 54.64541% 的变异发生在群体间,45.35459% 的变异发生在群体内。群体间的遗传分化系数 G_{st} 为 0.5067 和由 G_{st} 估算的基因流 N_m 为 $0.4867 < 1$ 。分析显示长蛸具有较高遗传多样性水平,但群体间已经出现了较大程度的遗传分化。

关键词 长蛸, 遗传多样性, ISSR

中图分类号 Q24

长蛸(*Octopus variabilis*)俗名章鱼、八带虫、八腿蛸、八爪章,隶属头足纲、八腕目、蛸科、蛸属,是我国沿海广布种,营养丰富,肉味鲜美,生长速度较快(董正之, 1988)。作为我国出口日、韩等国的名优海产品,长蛸市场潜力十分巨大,但同时,黄、渤海捕捞力度加大造成了自然资源严重衰退。目前,我国沿海已逐渐开展了长蛸的人工养殖。同时,为了有效利用和保护蛸科的种质资源,非常有必要开展有关蛸科动物的遗传结构和遗传变异水平的研究。国内关于长蛸形态、生态分布、组织学与组织化学的研究已见报道(董正之, 1988; 孙同秋等, 2008; Zheng *et al.*, 2002; 许星鸿等, 2008; 崔龙波等, 2001),近年来,随着分子生物学技术在水生生物中的广泛应用,长蛸的分子遗传研究也受到人们的关注。国内外有关长蛸的种质资源遗传多样性的研究,目前主要采用了等位酶技术(高强等, 2009)、线粒体部分序列片段 CO (常抗美等, 2010; 孙宝超等, 2010)以及线粒体 DNA

16S rRNA 基因片段分析(李焕等, 2010)等方法,对我国自然海域的野生长蛸群体的遗传变异进行了研究。ISSR (Inter simple sequence repeat)分子标记具有丰富的多态性、稳定的可重复性,在许多水生生物的群体遗传学研究中获得了理想的效果(Liu *et al.*, 2006; 杨太有等, 2008; 陈燕妮等, 2010)。本研究在此背景下,采用 ISSR 技术对黄海、渤海、东海 7 个地理群体(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)长蛸资源的遗传变异和种群结构进行研究,为进一步分析长蛸不同地理种群之间的遗传分化提供基础数据,同时也为长蛸种质资源的评价、保护和合理利用提供遗传学上的依据。

1 材料与方 法

1.1 材料

实验所用野生长蛸(*Octopus variabilis*)样品取自渤海、黄海、东海海域,具体采样地点分别为辽宁

* 国家高技术研究发展计划(863 计划)课题“名贵头足类苗种规模繁育关键技术”, 2010AA10A404 号; 国家海洋公益性行业科研专项, 201005013 号; 海洋渔业科学与技术浙江省重中之重学科开放课题, 20100105 号; 浙江海洋学院人才引进启动项目, 21135011509 号。郭宝英, 博士, 讲师, E-mail: guobaobao1981@yahoo.com.cn

收稿日期: 2010-09-21, 收修改稿日期: 2010-11-26

大连(DL)、山东烟台(YT)、山东青岛(QD)、江苏连云港(LYG)、浙江舟山(ZS)、浙江温州(WZ)和福建厦门(XM)近海的 7 个地理区域,各地所采样本数为 30 个,活体空运回实验室,解剖取肌肉,分装样品袋中置于 -74°C 超低温冰箱保存。

1.2 基因组 DNA 提取

参照《分子克隆实验指南》(Sambrook *et al*, 1989),采用常规酚-氯仿法提取基因组 DNA,方法略有改动。提取后用 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测其质量,紫外分光光度计检测其浓度和纯度,调整浓度至 $30\text{ng}/\mu\text{l}$, 4°C 保存备用。

1.3 ISSR-PCR 扩增

根据哥伦比亚大学公布的第 9 套 ISSR 引物序列,由上海英骏生物技术公司合成,共 100 条。对 PCR 反应过程中影响较大的 *Taq* 酶浓度(0.5、1.0、1.5、2.0U/ μl)、 Mg^{2+} 浓度(1.0、1.5、2.0、2.5、3.0mmol/L)、dNTPs 浓度(0.1、0.15、0.2、0.25、0.3mmol/L)、引物浓度(0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 $\mu\text{mol/L}$)、模板浓度(20、30、40、50、60、70ng)等 5 个因子及退火温度(50°C 、 51°C 、 52°C 、 53°C 、 54°C),分别设置不同的浓度梯度,进行 PCR 反应体系的优化。优化后 $25\mu\text{l}$ ISSR-PCR 反应体系为: *Taq* 酶 1.5U, Mg^{2+} 2mmol/L, dNTPs 0.15mmol/L, 引物 0.4 $\mu\text{mol/L}$, DNA 模板量约 50ng。PCR 反应程序为 95°C 预变性 5min, 后 94°C 变性 45s, 52°C 退火 40s, 72°C 延伸 90s, 38 个循环后, 72°C 延伸 17min。利用优化的 ISSR-PCR 体系,对合成的 100 条引物进行筛选。用筛选出的特异性好、重复性高的引物进行 PCR 扩增,以 100—2000bp 的 DNA 标准分子量为参照,扩增产物在 $1\times\text{TBE}$ 缓冲液、电压 100V 的电泳条件下,用 1.5%的琼脂糖凝胶进行电泳分离,电泳后在

凝胶成像系统下观察并拍照。

1.4 数据统计与分析

ISSR 为显性标记,在琼脂糖凝胶电泳图谱上,同一引物扩增产物中电泳迁移率一致的条带被认为属于同一位点,记录清晰稳定的电泳条带,按条带的有无分别记为“1”和“0”,构成 ISSR 表型数据矩阵。对下列指标进行统计分析:多态位点比例、观测等位基因数、有效等位基因数、Nei's 基因多样性指数、Shannon's 信息指数、群体间的遗传分化系数和基因流、遗传相似度和 Nei's 遗传距离。以上分析采用 POPGENE (version 1.32) (Yeh *et al*, 1997)软件进行统计。用 Arlequin 3.1 统计软件中的变异分析(ANOVA) (Excoffier *et al*, 1992)对以上指标进行显著性检验。利用 MEGA (version 4.0)软件(Tamura *et al*, 2007)对 Nei 遗传距离进行 UPGMA 聚类分析。

2 结果

2.1 ISSR-PCR 的扩增结果

本研究从 100 个 ISSR 引物中筛选出扩增条带清晰、重复性好、多态型高的引物 7 个,共扩增出 118 多条重复性好且带型清晰的 ISSR 扩增带,其中多态条带为 55 条,多态性比例 46.61%,每个引物检测出的多态标记数 6—10 个不等,平均每条引物产生 7.9 条多态标记(表 1),扩增片段大多在 100—2000bp 之间(图 1)。

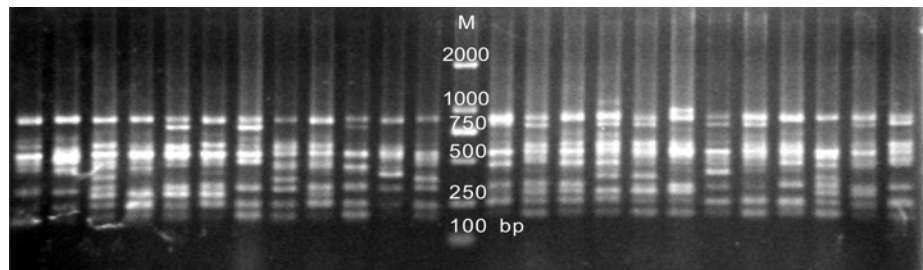


图 1 引物 UBC834 对舟山群体的扩增图谱

Fig.1 The amplification patterns of primer UBC834 in Zhoushan population

表 1 筛选出的引物序列及扩增结果

Tab.1 Sequence of primers elected and the amplification results

引物	序列(5'—3')	总位点数	多态位点数	多态位点比例(%)
UBC 834	AGA GAG AGA GAG AGA GYT	19	9	47.37
UBC 836	AGA GAG AGA GAG AGA GYA	18	10	55.56
UBC 840	GAG AGA GAG AGA GAG AYT	16	8	50.00
UBC 841	GAG AGA GAG AGA GAG AYC	18	8	44.44
UBC 845	CTC TCT CTC TCT CTC TRG	18	7	38.89
UBC 849	GTG TGT GTG TGT GTG TYA	13	6	46.15
UBC 851	GTG TGT GTG TGT GTG TYG	16	7	43.75

2.2 不同群体的遗传多样性分析

分析 7 个长蛸群体的多态位点比例、观测等位基因数、有效等位基因数、Nei's 基因多样性指数和 Shannon's 信息指数结果(表 2), 结果表明, 连云港群体的多态位点比例明显高于其它群体, 烟台群体的多态位点比例次之, 舟山和温州群体的多态位点比例较为接近, 大连、青岛和厦门群体的多态位点比例最低。从 Nei's 基因多样性指数(h)和 Shannon's 信息指数(I)来看, 连云港群体遗传多样性水平最高, 舟山

群体次之, 温州和厦门群体较为相近, 大连和烟台群体遗传多样性水平较低, 青岛群体最低。通过方差分析发现 Nei's 基因多样性指数和 Shannon's 信息指数均在 7 个长蛸群体间存在显著差异。

对每个位点上的有效等位基因数 N_e 、 h 和 I 进行统计与分析, 发现在群体水平上, $N_e = 1.2710$, h 和 I 值分别为 0.1573 和 0.2355; 在物种水平上, $N_e = 1.5317$, h 和 I 值分别为 0.3145 和 0.4766。总体分析发现, 长蛸仍具有较高的遗传多样性水平。

表 2 7 个长蛸群体的遗传多样性结果
Tab.2 Results of genetic diversity of seven populations of *O. variabilis*

群体	大连	烟台	青岛	连云港	舟山	温州	厦门	均值
总位点数	118	118	118	118	118	118	118	118
多态位点数	52	59	51	63	55	57	52	55.57
多态位点比例(%)	44.07	50.00	43.22	53.39	46.61	48.31	44.07	47.10
观测等位基因数	1.4407±0.4986	1.5000±0.5021	1.4322±0.4975	1.5339±0.5010	1.4661±0.5010	1.4831±0.5018	1.4407±0.4986	1.4710
有效等位基因数	1.2606±0.3633	1.2546±0.3532	1.2373±0.3338	1.3173±0.3862	1.2864±0.3800	1.2720±0.3679	1.2690±0.3729	1.2710
Nei's 基因多样性指数(h)	0.1510±0.1971	0.1503±0.1904	0.1421±0.1876	0.1816±0.2057	0.1633±0.2044	0.1577±0.1976	0.1548±0.1986	0.1573
Shannon's 信息指数(I)	0.2253±0.2830	0.2290±0.2725	0.2146±0.2730	0.2704±0.2917	0.2417±0.2916	0.2370±0.2818	0.2308±0.2844	0.2355

2.3 群体间的遗传距离与聚类分析

根据 Nei's 遗传距离用 MEGA 4.0 软件构建 7 个长蛸群体的 UPGMA 系统树(图 2), 结果为大连群体与烟台群体亲缘关系最近, 其次是连云港群体与大连、烟台两个群体亲缘关系较近, 再依次根据亲缘关系由近到远为舟山群体、青岛群体、温州群体和厦门群体。其中 Nei 无偏倚遗传距离范围为 0.1349—0.3561, 遗传相似度范围为 0.7004—0.8738(表 3), 7 个群体间的平均遗传距离为 0.2548, 平均遗传相似度为 0.7764。

2.4 遗传变异与分化

用 Arlequin3.1 软件对 7 个长蛸群体进行 AMOVA 遗传变异方差分析, 分别计算群体内和群体间变异对总变异的贡献率(表 4), 结果表明, 长蛸 54.64541% 的变异发生在群体间, 45.35459% 的变异发生在群体内, 显示长蛸群体的遗传变异主要来自群体间, 但群体内的变异亦处于较高水平。

从群体间的遗传分化系数($G_{st} = 0.5067$)和由 G_{st} 估算的基因流($N_m = 0.4867$)来看, 长蛸群间依然存在基因流, 但群体相互之间已发生了一定程度的遗传分化。

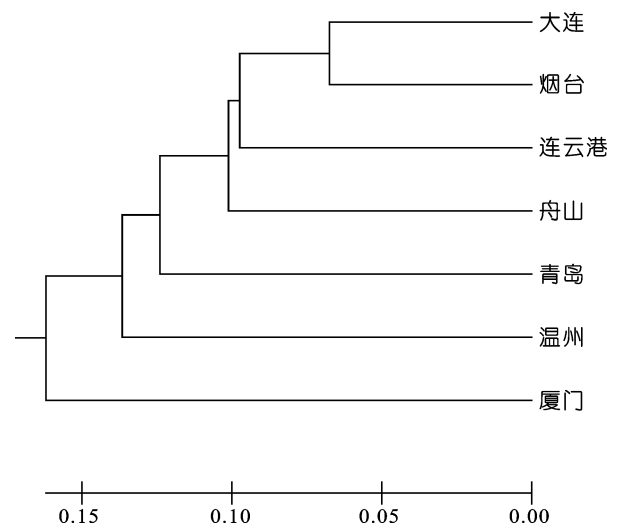


图 2 7 个长蛸群体的 UPGMA 聚类图
Fig.2 UPGMA dendrogram of the seven populations of *O. variabilis*

3 讨论

3.1 长蛸的遗传多样性

不同物种对 ISSR 的反应条件是有差别的, 要把 ISSR 技术应用到长蛸上, 就必须探索长蛸的最适 ISSR 反应条件。研究结果证明, 采用不同的反应体系会对 ISSR 扩增产生较大的影响, 从而影响 ISSR 分析

表 3 7 个长蛸群体间的遗传相似系数(对角线上方)和遗传距离(对角线下方)

Tab.3 Genetic similarity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal) among seven populations of *O. variabilis*

群体	大连	烟台	青岛	连云港	舟山	温州	厦门
大连	—	0.8738	0.8006	0.8287	0.8082	0.7906	0.7128
烟台	0.1349	—	0.8037	0.8173	0.8218	0.7518	0.7106
青岛	0.2224	0.2185	—	0.7692	0.7496	0.7335	0.7291
连云港	0.1879	0.2017	0.2624	—	0.8208	0.7591	0.7004
舟山	0.2129	0.1962	0.2882	0.1975	—	0.7625	0.7426
温州	0.2236	0.2853	0.3099	0.2756	0.2712	—	0.7480
厦门	0.3386	0.3416	0.3189	0.3561	0.2976	0.2903	—

表 4 长蛸 7 个群体遗传变异的 AMOVA 分析

Tab.4 Analysis of molecular variance (AMOVA) of *O. variabilis* seven populations

变异来源	自由度	离差平方和	变异组分	变异百分率(%)	P
居群间	6	1624.261	11.03101	54.64541	<0.001
居群内	161	1455.727	9.15552	45.35459	<0.001

注: P 值为交换 1000 次单倍型的显著性检验

的准确性, 而 ISSR 带谱的准确性与稳定性是进行遗传多样性分析的前提条件。要利用这一新型分子标记对长蛸进行遗传多样性分析, 获得重复性和可靠性较高的 ISSR 带谱, 就必要对其影响因子进行筛选和优化。

生物群体的遗传多样性是评价生物资源状况的一个重要依据, 是物种适应多变的环境条件、维持长期生存和进化的遗传基础, 对种群内和种群间遗传多样性的认识在进行种质鉴定和亲本选择时具有重要的现实意义(陈灵芝, 1993)。Nei's 基因多样性指数(h)和 Shannon's 信息指数(I)是衡量物种遗传多样性的重要参数。本研究得到的长蛸物种水平上的 h 和 I 值分别为 0.3174 和 0.4772, 故长蛸在种的水平上仍具有较高的遗传多样性; 但在群体水平上的遗传多样性相对较低, 并且不同群体的遗传多样性存在明显差异。

根据本文所得遗传多样性参数看, 连云港群体($h = 0.1816, I = 0.2704$)和舟山群体($h = 0.1633, I = 0.2417$)具有较丰富的遗传多样性, 可能蕴藏着比较大的进化潜能及比较丰富的育种潜力, 对其不断进行选育, 将能获得可用于育种的优良长蛸亲本。因此, 通过对野生长蛸遗传多样性的分析, 从而评价自然灾害和人工干预对其种质资源所带来的遗传学影响, 对今后长蛸种质资源的保护、合理开发利用及选择育种具有重要的现实意义。

3.2 长蛸群体间的亲缘关系与遗传分化

聚类分析的先后顺序可反映出种群间亲缘关系的远近, 通过估算遗传距离并构建系统树, 可以评价

种群间的遗传结构和分化程度。本研究聚类分析的结果表明, 我国的长蛸种群已至少存在 2 个地理类群的分化, 一个由大连、烟台、青岛、连云港、舟山和温州 6 个群体组成, 而另一个由厦门群体组成。这与常抗美等(2010)采用线粒体 DNA 细胞色素氧化酶亚基 I(COI)基因序列测定技术来研究分析长蛸群体遗传变异研究所得结果存在差异, 他们研究认为温州群体单独成群。本文研究发现温州群体与大连、烟台、青岛、连云港和舟山五个群体的分化程度不大, 这种结果差异可能是由于运用不同的分子技术造成的, 因而, 长蛸群体真实的分化情况、遗传特征及不同群体的特征分子标记位点确定, 还需结合其它分子标记技术进行进一步审定。

长蛸的穴居生活习性可能是我国沿海长蛸种群这种遗传结构形成的原因: 穴居一方面使长蛸将受精卵产入洞穴中, 既有效地保护了受精卵, 又防止了其卵子及幼体随洋流作长距离扩散, 另一方面长蛸是雌雄异体, 水平移动的范围较小, 限制了长蛸种群在沿岸作长距离运动和迁徙, 从而造成群体分布的空间不连续而造成的地理隔离, 影响了我国长蛸资源各地理群体间基因的交流。同时不同地域长蛸群体的生存环境不同, 如饵料、敌害、水质状况以及人为因素造成的有效繁育群体数量减少等生存环境因素的不同, 造成长蛸群体所承受的生境选择压力存在差异, 最终导致了不同长蛸地理群体的分化。但这不能解释出现大连、烟台、青岛、连云港、舟山和温州 6 个长蛸群体存在相对均值性遗传结构的原因。一种

可能的解释是位于黄、渤海海域的大连、烟台、青岛、连云港群体随着更新世以来的冰期造成黄、渤海多次海平面的下降而曝为陆地,而迁入东海海域,冰期过后又随海水由东海海槽侵入黄、渤海海域,与部分东海群体一起返回黄、渤海海域。这种海平面的反复升降,造成大连、烟台、青岛、连云港长蛸群体反复的迁入和迁出黄、渤海海域,从而与东海部分海域的舟山和温州长蛸群体产生广泛的基因交流,进而造成6个长蛸群体相对均值性的遗传结构。海洋生物遗传结构由于更新世以来冰期造成的海平面反复升降而发生变化的情况在多种生物中已见报道(Hewitt, 2000; Liu *et al.*, 2007; Han *et al.*, 2008)。常抗美等(2010)讨论的黄、渤海海域的大连、烟台、青岛、连云港群体仅与东海海域的舟山存在基因交流,而导致温州群体单独成支,这可能是由于作者基于所得实验结果所作出的推论。本研究根据所得实验结果分析推断黄、渤海海域海平面的多次升降造成与北方4个长蛸群体进行基因交流的东海长蛸群体涵盖温州群体。故更新世以来冰期造成的海平面反复升降而导致长蛸遗传结构真实的改变情况还需结合其它相关研究进一步探索。

同时,中国沿海的海洋潮流运动促进了6个长蛸群体相对均值性遗传结构的形成。作为世界海洋第二大暖流的黑潮是影响我国海域海流的大型洋流,发源于北赤道,紧贴台湾东部进入东海,在琉球群岛附近形成一支,经济州岛进入黄海和渤海。这支黄海暖流到达渤海口致使渤海内形成逆时针的环流,出渤海经山东半岛向南形成黄海沿岸流,经舟山群岛一直到达南海海域,因其在南下的流动中并不完全连续,故自北向南分别为鲁北沿岸流、苏北沿岸流、浙闽沿岸流和广东沿岸流(马超, 2009)¹⁾。自浙江东南向福建沿岸的浙闽沿岸流经过温州,而与其流向相反的黑潮自台湾的西北流分支北上流动(于非等, 2002)。南下的黑潮分支与北上的黑潮自台湾的西北流分支使温州群体与大连、烟台、青岛、连云港及舟山群体随海流迁移而产生广泛的基因交流,从而导致长蛸群体相对均值性遗传结构的形成。

遗传分化系数(G_{st})和基因流(N_m)是两个最能反映遗传分化的指标(Labate, 2000),从 G_{st} 指数来看,本文中7个群体间的遗传分化系数(G_{st})为0.5067,显示长蛸的群体之间已经出现了较大程度的遗传分化;

根据群体遗传学理论,不管群体大小,当基因流 $N_m < 1$, 遗传漂变就成为影响群体遗传结构的主要因素(Walker *et al.*, 2001),本文得出长蛸7个群体间的基因流 $N_m = 0.4867$,说明遗传漂变对长蛸群体的遗传结构有重要影响。遗传漂变会造成一些等位基因的丢失和另一些等位基因的固定,由此可产生两个遗传结果:一是群体内遗传多样性的减少,杂合性降低,这与近交繁殖的作用相似。它与一些有害基因的固定一道增加了群体的脆弱性,在小群体中尤其如此,因为有害基因更趋向于固定而不是因遗传漂变而丢失;二是同一物种群体间分化的增加。有害基因为选择所清除,不同的有益基因或中性基因的固定可能引起同一物种对不同环境的适应,再通过生存空间的扩展,形成了物种的微进化(刘占林等, 1999)。故遗传漂变对长蛸群体遗传分化的影响不可忽视。长蛸群体这种分化格局的出现是多种因素作用的结果,这些因素的综合作用最终导致长蛸群体间遗传分化的出现。

参 考 文 献

- 于非, 臧家业, 郭炳火等, 2002. 黑潮水入侵东海陆架及陆架环流的若干现象. 海洋科学进展, 20(3): 21—27
- 刘占林, 赵桂仿, 1999. 居群遗传学原理及其在珍稀濒危植物保护中的应用. 生物多样性, 7(4): 340—346
- 许星鸿, 阎斌伦, 郑家声等, 2008. 长蛸生殖系统的形态学与组织学观察. 动物学杂志, 43(4): 77—84
- 孙同秋, 曾海祥, 柴晓贞等, 2008. 长蛸的生物学特性和室内暂养技术. 齐鲁渔业, 25(4): 33—34
- 孙宝超, 杨建敏, 孙国华等, 2010. 中国沿海长蛸(*Octopus variabilis*)自然群体线粒体 COI 基因遗传多样性研究. 海洋与湖沼, 41(2): 259—265
- 李 焕, 吕振明, 常抗美等, 2010. 中国沿海长蛸群体 16S rRNA 基因的遗传变异研究. 浙江海洋学院学报(自然科学版), 29(4): 325—330
- 杨太有, 关建义, 陈宏喜, 2008. 三个地理群体赤眼鳟遗传多样性的 ISSR 分析. 水生生物学报, 32(4): 529—533
- 陈灵芝, 1993. 中国的生物多样性: 现状及其保护对策. 北京: 科学出版社, 99—113
- 陈燕妮, 孙振兴, 常林瑞, 2010. 长竹蛸不同地理居群的遗传多样性. 水生生物学报, 34(2): 270—277
- 高 强, 郑小东, 孔令锋等, 2009. 长蛸 *Octopus variabilis* 自然群体生化遗传学研究. 中国海洋大学学报, 39(6): 1193—1197
- 常抗美, 李 焕, 吕振明等, 2010. 中国沿海7个长蛸(*Octopus variabilis*)群体 COI 基因的遗传变异研究. 海洋与湖沼, 41(3): 307—314

1) 马 超, 2009. 黑潮对东中国海主要流系的影响. 青岛: 中国海洋大学博士学位论文, 1—18

- 崔龙波, 赵 华, 2001. 长蛸唾液腺和消化腺的组织学与组织化学研究. 海洋科学, 25(7): 38—41
- 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
- Excoffier L, Smouse P E, Quattro J M, 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131(2): 479—491
- 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
- Hewitt G M, 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*, 405: 907—913
- Labate J A, 2000. Software for population genetic analyses of molecular marker data. *Crop Science*, 40(6): 1521—1528
- 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
- Liu Y G, Chen S L, Li J *et al*, 2006. Genetic diversity in three Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) populations revealed by ISSR markers. *Aquaculture*, 255(1—4): 565—575
- Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T, 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1584
- Tamura K, Dudley J, Nei M *et al*, 2007. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24(8): 1596—1599
- Walker C W, Vila C, Landa A *et al*, 2001. Genetic variation and population structure in Scandinavian wolverine (*Gulo gulo*) populations. *Molecular Ecology*, 10(1): 53—63
- Yeh F C, Boyle T J B, 1997. Population genetic analysis of codominant and dominant markers and quantitative traits. *Belgian Journal of Botany*, 129(2): 157
- Zheng X D, Wang R C, 2002. Morphological study on radula of nine cephalopods in the coastal waters of China. *Journal of Fisheries of China*, 26(5): 417—422

GENETIC DIVERSITY OF DIFFERENT GEOGRAPHICAL POPULATIONS IN *OCTOPUS VARIABILIS* REVEALED BY ISSR ANALYSIS

GUO Bao-Ying, ZHOU Chao, LÜ Zhen-Ming, LI Ji-Ji, WU Chang-Wen
(Zhejiang Ocean University, Key Laboratory of Mariculture Equipments and Engineering
Technology of Zhejiang Province, Zhoushan, 316004)

Abstract In this study, genetic diversity among 168 individuals of 7 different geographical populations of the *Octopus variabilis* were analyzed after we had established the ISSR-PCR optimal reaction system by the Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) markers. The samples of the seven populations were taken from Dalian, Yantai, Qingdao, Lianyungang, Zhoushan, Wenzhou and Xiamen, respectively. Under predetermined optimal reaction conditions, total of 118 reproducible and clear DNA fragments from seven populations were amplified with seven primers, in which 55 fragments were polymorphic, and the proportion of polymorphic loci was 46.61%. The Nei's gene diversity and Shannon's information index of the *O. variabilis* was 0.3145 and 0.4766 at species level, 0.1573 and 0.2355 at population level, respectively. 7 populations could be apparently divided into 2 groups. The AMOVA demonstrated that the among-population component accounted for 54.64541% of the total variation, while the within-population component accounted for 45.35459%. The genetic differentiation coefficient (G_{st}) and the gene flow (N_m) were 0.5067 and 0.4867 (< 1), respectively among the 7 populations. These data indicate that the genetic diversity of *O. variabilis* is relatively high, and there is genetic differentiation of some extent among the seven populations of *O. variabilis*.

Key words *Octopus variabilis*, Genetic diversity, ISSR