

# 基于 *Cyt b* 基因序列的中国沿海 4 个长蛸 (*Octopus variabilis*) 群体的种群遗传结构分析\*

李红梅 吕振明 刘立芹 吴常文 张建设

(浙江海洋学院 浙江省海洋生物种质资源发掘利用工程实验室 舟山 316004)

**提要** 采用线粒体 *Cyt b* 基因测序技术研究了我国不同海域 4 个长蛸(*Octopus variabilis*)群体的种群遗传结构。结果表明, 232bp 的 *Cyt b* 基因片段在 4 个群体 90 个个体中共检测到 38 个多态位点、12 个单倍型, 单倍型多样性指数  $H$  达  $0.854 \pm 0.015$ , 核苷酸多样性指数  $P_i$  达  $0.059 \pm 0.005$ , 平均核苷酸多样性指数  $K$  达 13.526, 显示出较高的遗传变异。种群遗传结构分析表明, 4 个群体间均存在极显著的遗传分化( $P < 0.01$ ), 除大连与青岛两群体间外, 其它两两群体间的基因流均小于 1。聚类分析表明, 4 个群体明显分化为三大类群, 一个类群由大连和青岛群体组成, 一个由温州群体组成, 另一个由东山群体组成; 遗传距离分析表明, 东山类群与其它类群之间可能为亚种水平的分化, 而其它类群之间仍为种内群体间分化。长蛸这种种群遗传结构形成原因可能与其较弱的种群扩散能力有关, 另外冰川期地理历史因素及我国海域的洋流作用可能也参与了长蛸种群遗传结构的形成。

**关键词** 长蛸; 种群遗传结构; 线粒体; 细胞色素 *b*

**中图分类号** Q953

对海洋渔业资源种群遗传结构的了解是实现其合理开发和可持续管理的基础。种群遗传结构的研究不仅可以为渔业资源种群结构、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(Frankham, 1995; Lintas *et al*, 1998; Amaral *et al*, 2007), 同时还可以为人们制定科学合理的保护和开发措施提供指导(Han *et al*, 2008a)。近年来, 随着分子遗传学技术在渔业资源种群遗传结构中的广泛运用, 使许多渔业资源中存在的形态学及行为学难以分辨的精确遗传结构的分析成为可能, 分子遗传学技术已被广泛运用于海洋渔业资源种群结构、遗传分化及物种鉴定等研究中(Han *et al*, 2008a, b)。

长蛸(*Octopus variabilis*)是我国重要的海洋头足类渔业资源, 隶属软体动物门、头足纲、八腕目、蛸科(Octopodidae), 在我国南北沿海海域广泛分布。长蛸个体大、肉质肥厚鲜美、营养丰富, 富含蛋白质和

氨基酸, 可食用部分占总体的 90%以上, 具有较高的经济价值(吴常文等, 1995)。近年来随着我国海洋头足类资源开发的蓬勃发展, 长蛸的资源量却出现下降的趋势(徐开达等, 2008), 因此, 开展长蛸种群遗传结构的研究对今后长蛸资源的合理保护和开发具有重要意义。前期的等位酶、线粒体 16S rRNA、COI 基因及基因组 AFLP、ISSR 研究表明, 我国沿海海域的长蛸群体存在明显的种群遗传结构(高强等, 2009; 李焕等, 2010; 孙宝超等, 2010; 杨建敏等, 2011; 徐梅英等, 2011; 郭宝英等, 2011)。然而, 不同研究者对我国长蛸种群遗传结构格局存在较大的分歧。如高强等(2009)采用等位酶技术分析认为黄、渤海海域的长蛸群体存在微弱的分化; 孙宝超等(2010)、杨建敏等(2011)分别采用线粒体 COI 基因测序和基因组 AFLP 分析也认为, 黄、渤海至东海舟山海域长蛸群体存在 2 个类群的显著分化, 两者的分界线位于黄、

\* 国家科技支撑计划项目, 2011BAD13B08 号; 浙江海洋学院海洋渔业重中之重学科开放课题, 20100109 号。李红梅, 硕士研究生, E-mail: beiliuzhuang@126.com

通讯作者: 刘立芹, 博士, 讲师, E-mail: liuliqin-666@163.com

收稿日期: 2012-07-17, 收修改稿日期: 2012-09-29

渤海的青岛海域附近; 而徐梅英等(2011)、李焕等(2010)和郭宝英等(2011)采用线粒体基因测序及核基因 ISSR 分析表明黄、渤海至东海舟山海域长蛸群体为单一族群, 而它们与温州以南长蛸群体则存在极显著的分化。另外, 据徐梅英等(2011)和郭宝英等(2011)的研究证实, 黄、渤海至东海长蛸群体可能还存在亚种水平的分化, 其中福建东山群体与其它群体存在极大的遗传差异, 可能已达到亚种水平, 因此有必要获取更多的数据对我国长蛸群体种群遗传结构作更深入的分析。

本研究拟采用线粒体细胞色素 *b*(*Cyt b*)基因序列对黄、渤海至东海海域长蛸群体的种群遗传结构及变异进行进一步分析。线粒体细胞色素 *b* 基因进化速度适中, 适合物种遗传分化与种群结构研究, 被认为是解决物种遗传分化、分类及进化最可信的分子标记之一(Perdices *et al.*, 2005; 程起群等, 2008)。本研究将为研究我国长蛸自然资源种群遗传结构格局积累资料, 同时也为今后长蛸资源的可持续开发、管理和保护提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

长蛸取自黄海、渤海、东海海域, 采集地点分别为辽宁大连、山东青岛、浙江温州、福建东山渔码头。每个海域取长蛸 24 尾, 样品规格为 80—150g, 活体解剖后取新鲜肌肉放入 95%酒精固定液中保存, 带回实验室备用。

### 1.2 方法

**1.2.1 DNA 的提取** DNA 提取参考《分子克隆实验指南》(Sambrook *et al.*, 1989), 采用常规酚-氯仿方法进行, DNA 提取完毕之后, 在 DNA 样品中加 50 $\mu$ L T.E 溶模板液, 置于 4 $^{\circ}$ C 保存, 备用。

**1.2.2 *Cyt b* 基因扩增和测序** *Cyt b* 序列的扩增参照 Espineira 等(2010)的方法进行, 稍加改进。具体方法: 扩增引物 *Cyt b*-F: 5'-CGCCTCAAAGTAGCAT TATCAACAG-3'; *Cyt b*-R: 5'-GTTATATTCATGCTAA TGGNGCATC-3'; 序列扩增采用 50 $\mu$ l 反应体系, 其中含模板 DNA 50ng, 1 $\times$ 缓冲液, 2.0mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.2mmol/L dNTPs, 0.2nmol/L 引物及 3U *Taq* 酶。PCR 反应程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5min, 94 $^{\circ}$ C 变性 1min, 45 $^{\circ}$ C 退火 1min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1min, 共 45 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5min。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。扩增产物送往上海

Invitrogen 公司进行纯化并测序。

**1.2.3 数据分析** 所得序列采用 Clustal w1.83 软件进行编辑、排序和校对, 采用 DNAsp 4.10 软件对多态位点数、单倍型数、核苷酸多样性(*P*)、单倍型多样性(*H*)、平均核苷酸差异数(*K*)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来检测长蛸群体的遗传分化, 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; 各类群中单倍型的关系采用 Arlequin3.01 软件中简化的中介网络法(Bandelt *et al.*, 1995)进行构建。采用 Arlequin3.01 软件检测长蛸群体的遗传结构, 并计算群体间遗传分化系数  $F_{st}$  及显著性(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; 为检测群体遗传结构是否符合地理隔离模型, 对  $(1-F_{st})/2F_{st}$  与样本地理距离间的关系进行作图(Slatkin, 1993); 群体的遗传结构进一步采用 Arlequin3.01 软件中的分子变异分析(AMOVA)方法进行检测。

## 2 结果

### 2.1 序列组成和变异信息

对 4 个长蛸群体共 90 个个体的 *Cyt b* 序列进行测定, 经 Clustal w1.83 软件编辑和比对后, 获得了一个长度为 234bp 的同源序列, 经 Mega 3.1 软件分析表明, 该序列的 A、T、C、G 碱基含量分别为 43.2%、27.7%、20.8%和 8.3%, 其中 A+T 含量(70.9%)显著高于 C+G (29.1%)。DNAsp4.10 软件分析显示, 90 个个体共检测到 37 个变异位点, 其中单突变位点(Singleton variable sites)2 个, 简约信息位点(Parsimony informative sites)35 个; 这些变异在 90 个个体中共确定了 13 个单倍型, 单倍型多样性指数(*H*)达 0.854 $\pm$ 0.015, 核苷酸多样性指数(*P*)达 0.059 $\pm$ 0.005, 平均核苷酸多样性指数(*K*)达 13.526。在 12 个单倍型中, 除单倍型 1、3 为大连和青岛共有之外, 无一单倍型为两个以上群体所共有。各群体单倍型多样性指数和核苷酸多样性指数分别达 0.270—0.697、0.002—0.010; 平均核苷酸多样性指数达 0.437—1.104 (表 1)。

### 2.2 长蛸群体遗传结构分析

对 4 个群体的 *Cyt b* 基因序列进行比较, 结果表明群体间存在较大的核苷酸序列差异, 其中大连、青岛群体与东山群体存在 32 个固定核苷酸的差异, 大连、青岛群体与温州群体存在 10 个固定核苷酸的差异, 温州群体与东山群体间均存在 36 个固定核苷酸

表 1 基于 *Cyt b* 基因序列的长蛸 4 个群体的遗传变异参数统计  
Tab.1 Genetic variation parameters in four *O. variabilis* populations based on *Cyt b* gene sequences

变异参数	大连群体	青岛群体	温州群体	东山群体
个体数	22	23	23	22
多态位点比例	1.71%	0.86%	1.27%	1.28%
单倍型数	4	3	5	3
单倍型多样性指数( $H$ )	0.606±0.092	0.632±0.065	0.403±0.125	0.466±0.094
核苷酸多样性指数( $P_i$ )	0.005±0.005	0.003±0.001	0.002±0.002	0.002±0.001
平均核苷酸多样性指数( $K$ )	1.104	0.743	0.437	0.490

的差异, 而大连与青岛群体间存在 5 个固定核苷酸的差异(表 2)。MEGA3.1 分析显示, 4 个群体间的遗传距离为 0.005—0.156, 其中大连群体与青岛群体的遗传距离最小仅为 0.005; 大连、青岛群体与温州群体的遗传距离稍大为 0.019—0.023; 而大连、青岛、温州群体与东山群体的遗传距离最大为 0.146—0.156 (表 3)。采用 MEGA3.1 软件对 12 个单倍型进行 UPGMA 聚类分析表明(图 1), 所有单倍型可以明显聚为 3 个类群。其中大连和青岛群体的单倍型聚为一个类群; 温州群体的单倍型独为一个类群; 东山群体的单倍型独为一个类群。与 UPGMA 聚类分析结果相似, 单倍型网络关系图也揭示了这 3 个类群的分化, 3 个类群的单倍型网络关系图均以各自的主单倍型为中心呈现星状辐射(图 2)。其中从左向右, 在大连、青岛类群中, 主单倍型 H1 构成了网络关系图的中心, 该单倍型也为大连、青岛群体所共有; 在温州类群中, 主单倍型 H6 构成了网络关系图的中心, 该单倍型为

温州群体所独有; 在东山类群中, 主单倍型 H11 构成了网络关系图的中心, 该单倍型则为东山群体所独有。

3 个类群的遗传分化同样得到分子变异分析(AMOVA)的支持, 3 个类群间的变异有 95.95%存在于群体间, 而仅有 4.05%的变异存在于群体内。对 3 个类群所有群体的遗传分化系数和基因流进行计算表明, 群体间的遗传分化系数  $F_{st}$  达到 0.140—0.984 (表 3), 且两两之间的分化水平均达到极显著( $P<0.01$ ), 特别是东山群体与其它三个群体之间遗传分化系数更是达到 0.974—0.984 之间。各群体间的基因流  $Nm$  除大连和青岛群体间外( $Nm=3.06$ ), 基因流也均小于 1, 表明群体间的基因交流程度较低, 大连和青岛群体间的虽然也呈极显著分化( $P<0.01$ ), 但两群体间仍有丰富的基因流。对基因流与群体地理隔离距离关系进行作图表明, 基本呈现随距离增加基因流减少的趋势( $r^2 = 0.1744$ ), 如图 3 所示, 表明 4 个长蛸群体的种群遗传结构格局基本符合脚踏石模型。

表 2 长蛸 *Cyt b* 基因序列单倍型及在 4 个群体中的分布频率  
Tab.2 Haplotypes of *Cyt b* gene and its frequencies in four populations of *O. variabilis*

单倍型	变异位点				长蛸群体			
	122233445	111	1111111111	1122222	大连	青岛	温州	东山
	6024514095	5677899011	2223556667	8901223				
		8439514325	0790143468	1917042				
Hap1	TCACITTTTCG	TAATTTAAAT	TTCTATACT	TTAATCC	3	12		
Hap2	.....	..T.....	.....	.....	5			
Hap3	.....	.....	.....C...	.....	13	7		
Hap4	.....	..T.....	.....	...C.A	1			
Hap5	.....A	.....	.....	.....		4		
Hap6	.....A	.....C	.C.C.....	.....			17	
Hap7	.....A	.....C	.C.C.....	.....A				1
Hap8	.....A	.....C	.C.C.....	.....A				2
Hap9	.....C	.....C	.C.C.....	.....				1
Hap10	CTTCCCGAT	CTCCACCTT.	..AAAT.GAA	CAGT...				16
Hap11	CTTCCCGAT	CTCCACCTT.	..AAAT.GAA	CAGT..T				6
Hap12	CTTCCCGAT	CTCCACCTT.	C.AAAT.GAA	CAGT...				1

注: “.”表示与代表序列碱基相同

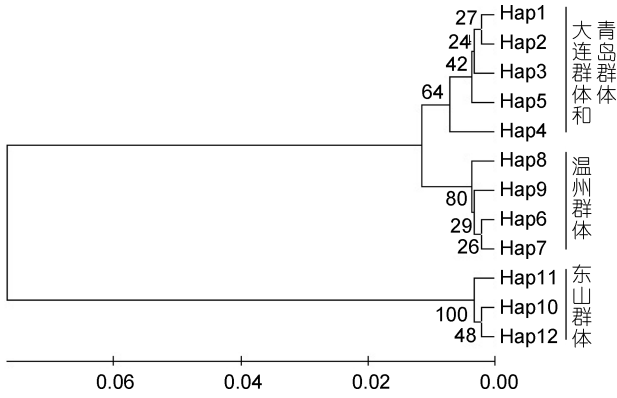


图 1 基于 *Cyt b* 基因单倍型的 4 个长蛸群体 UPGMA 聚类分析

Fig.1 UPGMA tree constructed using Nei's genetic distances for four *O. variabilis* populations based on *Cyt b* gene haplotypes data

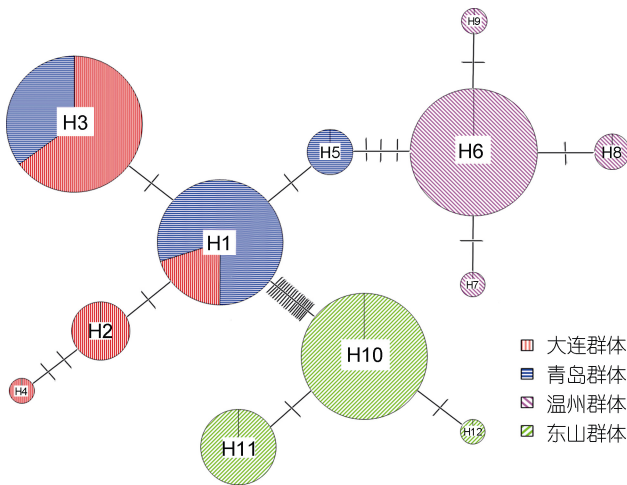


图 2 基于 *Cyt b* 序列的长蛸单倍型网络关系图

Fig.2 Unrooted minimum spanning trees showing genetic relationship among *Cyt b* gene haplotypes of *O. variabilis*  
注: 图中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

### 3 讨论

高强等(2009)采用同工酶技术首次对我国长蛸

自然群体的种群遗传结构进行研究, 结果表明黄、渤海海域大连与烟台、莱州长蛸群体有微弱的分化, UPGMA 聚类分析节点支持率为 59%。孙宝超等(2010)采用线粒体 COI 基因序列分析了黄、渤海至东海舟山海域的 5 个自然群体的种群遗传结构, 发现黄、渤海海域长蛸群体确实存在显著分化, 大连、烟台群体与青岛群体分化明显, 大连与烟台群体分化为一个类群, 青岛群体与东海区的连云港、舟山群体分化为一个类群。杨建敏等(2011)采用 AFLP 分子标记技术对同样 5 个群体进行研究, 发现类似的结果。但徐梅英等(2011)采用线粒体 COIII 和 12S rRNA 基因对黄、渤海至东海海域 7 个群体种群遗传结构作研究, 却发现大连、烟台、青岛群体无显著分化( $P>0.05$ ), 它们应与连云港、舟山群体作为一个类群来对待; 而该类群与东海区的温州、东山群体却存在极显著甚至是亚种的分化( $P<0.01$ )。该结果也得到了李焕等(2010)、郭宝英等(2011)线粒体 16S rRNA 基因和核基因 ISSR 研究结果的证实。

本研究采用线粒体 *Cyt b* 基因对上述海域的长蛸群体进行进一步研究, 结果发现所研究的大连、青岛、温州、东山 4 个群体两两之间均存在极显著的分化( $P<0.01$ ), 因此证实了高强等(2009)、孙宝超等(2010)、杨建敏等(2011)所得出的黄、渤海海域长蛸群体存在种群分化的说法; 而与徐梅英等(2011)、李焕等(2010)研究结果稍有出入, 可能是本研究所选用的 *Cyt b* 基因与 COIII、12S rRNA 及 16S rRNA 基因进化速率不同, 检测种群遗传结构时的分辨率有差异有关。但通过聚类分析和单倍型网络关系图的构建, 发现大连、青岛群体聚为一个类群, 而温州、东山群体分别独立聚为另外两个类群, 因而支持徐梅英等(2011)、李焕等(2010)和郭宝英等(2011)的研究结果, 支持将黄、渤海海域长蛸群体作为一个类群来对待。从本研究的数据来看, 虽然大连、青岛群体具有统计学意义上的遗传分化, 但两者的遗传分化系数仍然

表 3 长蛸群体之间的基因流以及遗传距离(左下角)和遗传分化系数(右上角)

Tab.3 Pairwise  $N_m$ , genetic distance (below) and  $F_{st}$  (above) values among populations of *O. variabilis*

长蛸群体	大连	青岛	温州	东山
大连	—	0.140(***)	0.842(***)	0.974(***)
青岛	3.064(0.005)	—	0.854(***)	0.980(***)
温州	0.094(0.023)	0.085(0.019)	—	0.984(***)
东山	0.013(0.148)	0.010(0.146)	0.008(0.156)	—

注: 左下角数据, 括号外为基因流  $N_m$ , 括号内为遗传距离。\*表示差异不显著( $P>0.05$ ); \*\*表示差异显著( $0.01<P<0.05$ ); \*\*\*表示差异极显著( $P<0.01$ )

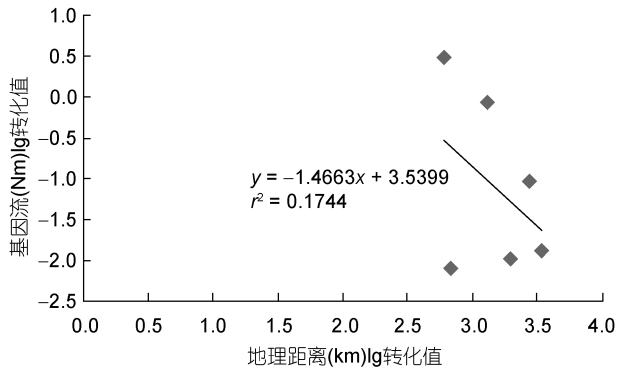


图3 种群基因流与地理距离间的相关性分析

Fig.3 Correlation between gene flow and geographic distance of *O. variabilis*

较小( $F_{st}=0.140$ ), 而两者的基因流  $Nm$  也大于 3, 单倍型网络关系图表明两个群体共享优势单倍型 H1 和 H3, 表明两个群体间有丰富的基因交流。孙宝超等(2010)通过线粒体 COI 基因研究时也发现大连、烟台类群与青岛、连云港、舟山类群在聚类时发生同一群体的不同个体聚类到不同的类群中的现象, 也推测两个类群可能存在较大的遗传渗透, 综合以上分析, 本文仍建议将黄、渤海海域的长蛸群体作为单一类群来对待。

但黄、渤海海域长蛸群体(大连、青岛)与东海区的温州、东山群体仍有极大的分化。从核苷酸序列差异来看, 大连、青岛群体与温州群体平均有 10 个固定核苷酸的差异; 大连、青岛群体与东山群体有 32 个固定核苷酸的差异; 而温州群体与东山群体有 36 个固定核苷酸的差异; 从遗传距离来看, 大连、青岛两群体与温州群体的遗传距离为 0.019—0.023, 大连、青岛两群体与东山群体的遗传距离为 0.146—0.156; 而温州与东山群体的遗传距离为 0.156。Nei(1976)利用遗传距离  $D$  值对物种的不同分类单位间的遗传分异水平作过定量性估计, 并指出同一物种内的地区种群间  $D$  值变动在 0—0.05 之间, 亚种间的  $D$  值约为 0.02—0.20, 种间遗传距离的变幅为 0.10—2.00 之间。对于其它一些动物的 *Cyt b* 基因序列的分析表明, 种内个体间的序列差异一般在 0—0.046 之间, 超过 0.06 的个体间已有明显的亚种或种的分化(Kimura, 1968; Yang *et al.*, 2002); 如孙红英等(2005)研究了绒螯蟹地理亚种间 *Cyt b* 基因的遗传差异, 发现不同绒螯蟹亚种间的遗传距离在 0.004—0.044 之间; 程起群等(2008)研究了长江、闽江和珠江中的凤鲚, 发现 3 个群体间的遗传距离在 0.08—0.108 之间, 因

而认为它们已达到亚种的分化; 但 Espineira 等(2010)研究了近 30 种头足类的 *Cyt b* 基因序列, 发现头足类种间遗传距离为  $0.209 \pm 0.013$ 。因此本研究中大连、青岛及温州两类群与东山类群应已达到亚种间的分化, 证实了徐梅英等(2011)、李焕等(2010)和郭宝英等(2011)的推测, 而大连、青岛类群与温州类群仍属于群体间的分化。至于造成我国长蛸群体间这种分化格局的原因, 一般认为与长蛸的生活史及底栖生活习性有关; 长蛸生活史中无浮游幼虫阶段, 幼体从附着于基质的受精卵孵出后即具成体形态并开始营底栖生活(董正之, 1991), 在以后的生活史中也很少迁移, 董正之(1991)认为长蛸在生长过程中只作潮间带上、下的迁移, 这为不同群体之间的基因交流造成了障碍。本研究发现, 所研究的 4 个群体两两均呈现显著性分化, 遗传结构符合脚踏石模型正好说明了这一点(Palumbi, 2003)。另外, 有研究者认为(李焕等, 2010)晚更新世以来我国海平面的反复升降和海域的洋流分布格局可能也是影响长蛸遗传分化格局的又一重要因素。

#### 参 考 文 献

- 孙红英, 王光跃, 张代臻等, 2005. 中华绒螯蟹与合浦绒螯蟹两地理亚种的线粒体 DNA 序列变异. 动物学报, 51(5): 862—866
- 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
- 杨建敏, 孙宝超, 刘相全等, 2011. 长蛸 5 个地理群体遗传多样性的 AFLP 分析. 见: 海洋资源科学利用论坛论文集. 济南: 山东科学技术出版社, 242—254
- 吴常文, 吕永林, 1995. 浙江北部沿海长蛸(*Octopus variabilis*)生态分布初步研究. 浙江水产学院学报, 14: 148—150
- 徐开达, 朱文斌, 李鹏飞等, 2008. 东海北部浅海渔场头足类的数量分布. 浙江海洋学院学报(自然科学版), 01: 27—31
- 徐梅英, 李继姬, 郭宝英等, 2011. 基于线粒体 DNA 12S rRNA 和 CO 基因序列研究中国沿海 7 个长蛸(*Octopus variabilis*)野生群体的遗传多样性. 海洋与湖沼, 42(3): 387—396
- 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
- 郭宝英, 周 超, 吕振明等, 2011. 长蛸(*Octopus variabilis*)不同地理群体遗传多样性的 ISSR 分析. 海洋与湖沼, 42(6): 868—873
- 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, 250—253
- 程起群, 马春艳, 庄平等, 2008. 基于线粒体 Cyt *b* 基因标记探讨凤鲙 3 群体遗传结构和进化特征. 水产学报, 32(1): 1—7
- Amaral A, Sequeira M, Mart í nez-Cedeira J *et al*, 2007. New insights on population genetic structure of *Delphinus delphis* from the northeast Atlantic and phylogenetic relationships within the genus inferred from two mitochondrial markers. Marine Biology, 151(5): 1967—1976
- Bandelt H J, Forster P, Sykes B C *et al*, 1995. Mitochondrial portraits of human populations using median networks. Genetics, 141: 743—753
- Espineira M, Vieites J M, Santaclara F J, 2010. Species authentication of octopus, cuttlefish, bobtail and bottle squids (families Octopodidae, Sepiidae and Sepiolidae) by FINS methodology in seafoods. Food Chemistry, 121: 527—532
- Frankham R, 1995. Conservation genetics. Annual Review of Genetics, 29: 305—327
- Han Z Q, Gao T X, Takashi Y *et al*, 2008a. Genetic population structure of *Nibea albiflora* in Yellow Sea and East China Sea. Fisheries Science, 74: 544—552
- Han Z Q, Li Y Z, Gao T X *et al*, 2008b. Population genetic structure of coral reef species *Plectorhinchus flavomaculatus* in South China Sea. African Journal of Biotechnology, 7(11): 1774—1781
- Kimura M, 1968. Evolutionary rate at the molecular level. Nature, 217: 624—626
- Lintas C, Hirano J, Archer S, 1998. Genetic variation of the European eel (*Anguilla anguilla*). Molecular Marine Biology and Biotechnology, 7(4): 263—269
- Nei M, 1976. Mathematical Models of Speciation and Genetic Distance. In: Karlin S, Nevo E ed. Population Genetics and Ecology. London: Academic Press, 723—766
- Palumbi S R, 2003. Population genetics, demographic connectivity, and the design of marine reserves. Ecological Applications, Supplement, 13(1): 146—158
- Perdices A, Sayanda D, Coelho M M, 2005. Mitochondrial diversity of *Opsariichthys bidens* (Teleostei Cyprinidae) in three Chinese drainages. Mol Phylogenet Evol, 37: 920—927
- Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T, 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edition. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 127—128
- Slatkin M, 1993. Isolation by distance in equilibrium and non-equilibrium populations. Evolution, 47: 264—279
- Yang X G, Wang Y Q, Zhou K Y, 2002. The authentication of *Oviductus ranae* and their original animals by using molecular marker. Bio Pharm Bull, 25: 1035—1039

## GENETIC STRUCTURE IN 4 *OCTOPUS VARIABILIS* POPULATIONS FROM CHINA COASTAL WATERS BASED ON MITOCHONDRIAL Cyt *b* GENE SEQUENCE

LI Hong-Mei, LÜ Zhen-Ming, LIU Li-Qin, WU Chang-Wen, ZHANG Jian-She  
(Zhejiang Provincial Key Laboratory of Marine Germplasm Resources Exploration and Utilization,  
College of Marine Sciences and Technology, Zhejiang Ocean University, Zhoushan, 316004)

**Abstract** Genetic structure in 4 *Octopus variabilis* populations from China coastal waters was investigated using mitochondrial cytochrome *b* gene (Cyt *b*) sequence. Results showed that, the aligned 232bp segment of the Cyt *b* gene sequence defined 38 polymorphic sites and 12 haplotypes in the ninety individuals of the four *O. variabilis* populations. The haplotype diversity (*H*) reached  $0.854 \pm 0.015$ , the mean nucleotide diversity ( $P_i$ ) reached  $0.059 \pm 0.005$ , and the average number of nucleotide differences (*K*) reached 13.526. Genetic structure analysis showed that, significant genetic differentiation were presented among the four *O. variabilis* populations ( $P < 0.01$ ). Most pairwise gene flow values between populations were less than 1 except that between Dalian and Qingdao populations. Three distinct clades were detected in four *O. variabilis* populations based on UPGMA phylogenetic analysis, with one clade composed of the two populations of Dalian and Qingdao, one composed of Wenzhou population, and one composed of Dongshan population. Genetic distance analysis suggested that the differentiation among Dongshan and other clades might reach the level of sub-species, while the differentiation among other clades should be within the inter-population level. The divergence of populations might be resulted from low dispersal ability of *O. variabilis* at both larva and adult stage. In addition, demographic historical accident and ocean currents may play important roles in the formation of population genetic structure in *O. variabilis*.

**Key words** *Octopus variabilis*; population genetic structure; mitochondrial; cytochrome *b*