南海鸢乌贼的遗传差异:种群分化还是种间分化

李敏,张鹏,张俊,张魁,陈作志

中国水产科学研究院南海水产研究所,农业农村部外海渔业开发重点实验室,广东 广州 510300

摘要:利用线粒体 ND2、COI 和 16S rDNA 序列,对 2012 年 9 月至 2015 年 9 月采自南海的鸢乌贼(*Sthenoteuthis oualaniensis*)样本进行了种群遗传结构的分析。系统发育关系显示鸢乌贼中型群和微型群各自形成了单系群分支,而分支内没有形成与地理群体或季节群体对应的支系。分子方差分析同样表明,地理群体或季节群体之间不存在明显的遗传分化,而中型群和微型群之间具有极显著的遗传分化(*F*_{ST}=0.94092~0.9899,*P*<0.0001)。遗传多样性分析显示,鸢乌贼中型群和微型群均呈现出较高的单倍型多样性(0.9465 和 0.8545)和较低的核苷酸多样性(0.0051 和 0.0021),中型群的遗传多样性指数要高于微型群。基于 ND2、COI 和 16S rDNA 序列计算的中型群和微型群之间的遗传距离分别达到了 14.0%、9.6%和 8.8%,远大于类群内的遗传分化(平均<1%)。研究结果表明,南海鸢乌贼存在分布高度重合且有显著遗传分化的两个种群,即中型群和微型群。中型群和微型群之间的遗传差异达到了种间分化的水平,提示体型较大、具有背部发光器的中型群鸢乌贼(典型鸢乌贼)与体型较小、背部发光器缺失的微型群 鸢乌贼可能是两个相互独立的种类。

鸢乌贼 [Sthenoteuthis oualaniensis (Lesson, 1830)]是隶属头足纲(Cephalopoda)柔鱼科(Ommastrephidae)的大洋性鱿类,广泛分布于印度洋、太平洋的赤道和亚热带等海域^[1-2],在印度洋西北部海域及中国南海的资源量较大^[3-5]。基于声学和灯光罩网评估显示,2014年南海中南部鸢乌贼资源量在200万t以上^[6],是南海大洋性资源中最有开发潜力的种类之一。

了解渔业资源的种群结构是对其合理开发和 科学管理的基础。鸢乌贼作为广泛分布的大洋性 种类,在世界范围内具有非常复杂的种群结构^[7-8]。 调查研究^[9-10]显示南海分布的鸢乌贼存在两种表 型类群(phenotypic forms),即背部具有发光器的 中型群(medium form)和背部发光器缺失的微型 群(dwarf form)。形态学分析^[10-12]表明这两个类群 的差异达到了种群水平。而另一项基于形态多元 分析^[13]的研究则表明南海鸢乌贼应划分为与地 理位置对应的几个种群。此外,还有一些研究提 出在不同的海域应按产卵时间来定义鸢乌贼的种 群,从而划分出相应的季节种群^[14-15]。

为验证上述种群划分的合理性, 探讨南海鸢 乌贼是否存在具有遗传学差异的不同种群, 本研 究利用广泛应用的线粒体 DNA 序列标记来分析 南海鸢乌贼的遗传分化, 明确其种群遗传结构, 以期为资源的可持续利用和渔业的管理提供科学 依据。

1 材料与方法

1.1 样本采集及分组

鸢乌贼个体样本通过灯光罩网渔船采集,经

收稿日期: 2018-06-04; 修订日期: 2018-08-02.

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFC1406500); 农业农村部财政专项(NFZX2018); 广东省自然科学基金项目(2014A030310177); 国家重点基础研究发展计划项目(2014CB441500).

作者简介:李敏(1984-),男,博士,副研究员,从事海洋生物多样性和保护研究. E-mail: limin@scsfri.ac.cn

通信作者: 陈作志, 博士, 研究员. E-mail: zzchen2000@163.com

形态学鉴定和生物学测量后,-20℃冰冻带回实验 室。采样点位置见图 1,样本采集时间、位点经纬 度及胴长范围见表 1。



每个采样点随机抽取 20 余尾鸾乌贼进行实 验,6个采样点样本总量为 136 尾。其中中型群个 体 108 尾, 胴长(133±24) mm, 微型群个体 28 尾, 胴长(86±20) mm。另外,按照样本采集时间,将采 集于 3—4 月的样本划分为春季群(64 尾),采集于 9—10 月的样本划分为秋季群(72 尾)。种群遗传 结构的判定将从地理群体(采样点)、季节群体(春 季群和秋季群)和表型群体(中型群和微型群)3 个 角度进行分析。

1.2 实验方法

1.2.1 DNA的提取 每个样本剪取 30 mg尾鳍肌 肉置于 1.5 mL 离心管内,使用快速组织细胞破碎 仪(BulletBlender STORM,美国)研磨后,用海洋 软体动物基因组 DNA 抽提试剂盒(天根,北京)提

取基因组 DNA,保存于-20℃冰箱。用 1%琼脂糖 凝胶电泳检测基因组 DNA 完整性和纯度,用 NanoDrop8000 超微量生物检测仪(ThermoFisher, 美国)检测 DNA 浓度。

表 1 鸢乌贼样本采集位置、时间和胴长范围 Tab. 1 Sampling location, date and mantle length range of Sthenoteuthis oualaniensis

采样点 sampling site	经度/纬度 longitude/latitude	采样时间 date of sampling	胴长/mm mantle length
А	116°55′E/20°41′N	2015-3, 2015-9	59-167
В	110°03′E/16°05′N	2012-10, 2014-4	81-160
С	117°28'E/15°06'N	2012-9, 2013-3	91-177
D	112°57′E/12°41′N	2014-4, 2016-10	61-159
Е	110°29′E/9°31′N	2012-10, 2013-4	65-186
F	113°04′E/5°24′N	2012-10, 2013-4	71-146

1.2.2 目标片段的扩增及测序 选取线粒体 NADH 脱氢酶 II(ND2)基因、细胞色素 c 氧化酶 I(COI)基因和 16S rDNA 为标记,参照 GenBank 中鸢乌贼线粒体基因组全序列(EU660576)设计目 标序列的扩增引物(表 2)。其中 ND2 和 16S rDNA 序列为单拷贝序列, 而 COI 基因在鸢乌贼线粒体 上有两个拷贝,本研究选取第一个拷贝(COI copy 1)进行特异引物的设计和扩增。PCR 反应体系总 体积为 50 µL, 依照 ExTaq 酶(TaKaRa, 大连)的 使用说明确定各组分的浓度。PCR 反应在热循环 仪(Eppendorf, 美国)上进行, 反应条件如下: 首 先 94℃预变性 2 min, 之后进行 35 个循环, 每个 循环包括 94℃变性 20 s、55~62℃退火 20 s、72℃ 延伸1min, 最后 72℃延伸 5 min。扩增产物经电 泳检验后选取单一条带产物进行双向序列测定, 测序引物与扩增引物相同。

表 2 线粒体序列扩增引物及 PCR 反应退火温度 Tab. 2 Primers and PCR reaction annealing temperature for mitochondrial sequences amplification

tempera	tture for inteoenonurfar sequences and	princation
目标片段 targeting sequence	引物(5'-3') primer (5'-3')	退火温度/℃ annealing temperature
ND2	F: GATATATCATATACGATTTCGGCT R: CCTGCCCAAATACCAAAAATAAAGT	62
COI	F: GTATTTGGGCAGGACTTCTAGGGA R: TAATGGCAAATATGGCGTGATCATG	55
16S	F: CTATATTCCCTAATAGGATCTTAA R: GAAGTTTATGTTGTGATTAAG	58

1.3 分析方法

1.3.1 序列编辑及进化模型 将测序获得的双向 序列用 DNAStar 软件包中 SeqMan 组装,所有序 列经 BioEdit 3.3^[16]编排后,用 MEGA 7 软件^[17]中 的 Muscle 模块^[18]进行比对(alignment)并手工校正, 多重排列的参数设置为程序默认值。在 MEGA 7 中利用 Models 模块进行核苷酸替代最适模型的 筛选,基于最大似然法(maximum likelihood)标准, 从 24 种核苷酸替代模型中筛选出几种序列标记 各自的最适模型,用于系统发育关系和群体遗传 结构分析。其中 ND2 和 16S rDNA 序列最适模型 为带 Gamma 参数(Gamma shape parameter)的 Tamura-Nei 模型^[19](TN93+G,G值分别为 0.153 和 0.069), COI 序列为带 Gamma 参数的 Tamura 三参数 模型^[20](T92+G,G=0.241)。

1.3.2 系统发育关系和遗传分化 选择各自序列标记的最适模型,将茎柔鱼(Dosidicus gigas)线粒体对应的同源序列作为系统分析的外类群(outgroup),在MEGA7中基于邻接法(NJ, neighbor-joining)分别构建ND2、COI和16SrDNA序列的系统发育树,系统树各分支的可靠性采用1000次重复抽样评估。基于Tamura-Nei模型(ND2和16SrDNA)和Tamura三参数模型(COI),在MEGA7中计算系统树分枝间及分枝内的遗传差异距离(net between/within group distance)。

1.3.3 种群遗传结构 使用 Arlequin 3.5 软件^[21], 采用分级分子方差分析(AMOVA, molecular variances)^[22], 基于分化固定指数(*F*_{ST})检验 3 种群体 划分模式下的遗传结构,即评价地理群体之间、季节群体之间和表型群体之间遗传差异的显著 性。通过 10000 次重复抽样来检验不同遗传结构 水平上协方差的显著性。

1.3.4 遗传多样性 鸢乌贼样本各个采样点(地 理群体)以及季节群体、表型群体的遗传多样性指 数如单倍型数目(*H*)、多态位点数目(*S*)、单倍型多 样性(*h*)和核苷酸多样性(π)等通过软件 DNAsp 5.0^[23]和 Arlequin 3.5 计算获得。

2 结果与分析

2.1 序列特征

共获得136条鸢乌贼线粒体ND2基因全序列,

经对齐后长度为 1041 bp。另外获得 62 条 COI 基 因全序列和 65 条 16S 全序列,长度分别为 1531 bp 和 1440 bp。其中 ND2 和 COI 序列没有插入和缺 失,16S rDNA 序列有 13 个位点存在插入和缺失。

2.2 系统发育关系

利用 ND2、COI 和 16S rDNA 序列基于邻接 法(NJ)构建的莺乌贼所有样本的系统发育树如图 2 所示。3 种序列标记的 NJ 树均展示出了具有明显 分化的两个支系,且分支的支持率均很高(自展值 大于 70%)。其中一个支系全部由中型群个体组成, 另一个支系全部由微型群个体组成,两个支系分 别形成了对应中型群和微型群的"单系群"。在两





Fig. 2 Phylogenetic tree for *Sthenoteuthis oualaniensis* using mitochondrial sequences based on neighbor-joining method The tail of every branch represents one individual; *Dosidicus gigas* was used as an out-group; Bootstrap supports of > 80% are shown at nodes.

个支系内部,来自各个地理群体的个体交叉在一起, 未形成明显的地理支系,两个季节群体也未聚成 分开的支系。系统发育关系表明南海鸢乌贼中型 群和微型群之间存在明显的遗传分化,而地理群 体间以及季节群体间并不存在明显的遗传分化。

2.3 群体遗传距离

依据系统发育树展示的结果,基于 Tamura-Nei 模型(ND2 和 16S rDNA)和 Tamura 三参数模型(COI) 计算了系统发育关系上有明显分化的两个支系(中 型群和微型群)的遗传距离(表 3)。结果显示两个表 型群之间 ND2 序列的遗传分化达到了 14.0%, COI 和 16S rDNA 的遗传分化也分别达到了 9.6%和 8.8%。 基于 3 个序列标记计算的中型群内和微型群内的遗 传分化均小于 1%,远低于两个类群之间的遗传分化。

2.4 种群遗传结构

基于 ND2 序列的南海鸢乌贼 3 种假定种群结构的 AMOVA 结果如表 4 所示。无论是按照地理群体还是季节群体来划分,群体间的遗传变异贡

献百分比均为负值,群体间遗传分化系数 F_{sT}值 也为负数,不支持地理群体或季节群体间存在具 有遗传分化的种群结构。而按照表型划分的中型 群和微型群之间的遗传变异占到了总变异的绝大 部分(98.98%),两个类群间的 F_{sT}值达到 0.9899 且极显著(P<0.0001),表明鸢乌贼中型群和微型 群之间存在极高的遗传分化。两个类群的单倍型 随机分布假设检验(P<0.0001)拒绝随机交配的假 设,表明这两个类群之间已产生了生殖隔离。

将中型群和微型群分别作为单独的样本整体, 再分别计算各自地理群体和季节群体的分子方差, 结果同样未检测到地理群体或季节群体间存在明 显的分化(未展示)。

基于 COI 和 16S rDNA 序列的 AMOVA 结果 (未展示)与上述结果一致,地理群体或季节群体 之间不存在明显的遗传分化,而中型群和微型群 之间具有极显著的遗传分化, F_{ST} 值分别为 0.9409 (P< 0.0001)和 0.9542 (P<0.0001)。

表 3 基于 3 种线粒体序列的鸢乌贼中型群体与微型群体间和群体内的遗传分化距离 Tab. 3 Genetic distances between and within medium form and dwarf form of *Sthenoteuthis oualaniensis*

		based on thre	ee mitochondrial	sequences		$\overline{x} \pm SD$
表型类群 phenotypic form	ND2		COI		16S rDNA	
	中型群 medium form	微型群 dwarf form	中型群 medium form	微型群 dwarf form	中型群 medium form	微型群 dwarf form
中型群 medium form	$0.0042{\pm}0.0008$		$0.0073 {\pm} 0.0012$		$0.0065 {\pm} 0.0012$	
微型群 dwarf form	$0.1395{\pm}0.0125$	$0.0020 {\pm} 0.0004$	$0.0957 {\pm} 0.0076$	$0.0036{\pm}0.0004$	$0.0877 {\pm} 0.0078$	$0.0016{\pm}0.0005$

表 4 基于 ND2 序列的 查乌贼不同分组模式下遗传变异的分子方差分析 Tab. 4 Analysis of molecular variances for different populations (forms, groups) of *Sthenoteuthis oualaniensis* based on ND2 sequences

分组模式 grouping pattern	变异来源 source of variation	变异百分比/% percentage of variation	遗传分化系数 F _{st}	
地理群体	地理群体间 among geographic populations	-1.34	-0.0134 (<i>P</i> =0.6358)	
geographic population	地理群体内 within geographic populations	101.34		
季节群体 seasonal group	春、秋群体间 between spring group and autumn group	-1.30	0.0120 (D-0.8201)	
	春、秋群体内 within spring group and autumn group	101.30	-0.0130(P=0.8301)	
表型群体	中、微型群体间 between medium form and dwarf form	98.98	0.9899 (<i>P</i> =0.0000)	
phenotypic form	中、微型群体内 within medium form and dwarf form	1.02		

2.5 遗传多样性

以ND2序列为例计算了南海鸢乌贼遗传多样 性统计数据(表 5)。样本整体共检测到 186 个多态 性位点, 定义了 105 个单倍型, 反映出很高的单倍 型多样性(0.9603±0.0088)和核苷酸多样性(0.1496± 0.0714)。按照地理群体和季节群体的划分,各群 体遗传多样性水平与样本整体一致,无明显差 异。而如果按表型群的划分来单独计算,则中型

Tab. 5 Descriptive statistics of genetic diversity of Sinenoteumis budunnensis based on AD2 sequences					
假设群体 presumptive group	样本量 number of samples, N	单倍型数量 number of haplotypes, <i>H</i>	多态性位点数 number of polymorphic sites, S	单倍型多样性(<i>h</i> ±SD) haplotype diversity	核苷酸多样性(π±SD) nucleotide diversity
А	21	15	139	$0.9571 {\pm} 0.0301$	$0.1924{\pm}0.0958$
В	23	18	149	$0.9723 {\pm} 0.0223$	$0.1615 {\pm} 0.0801$
С	21	19	153	$0.9905{\pm}0.0178$	$0.1192{\pm}0.0595$
D	24	16	148	$0.9457{\pm}0.0291$	$0.1928{\pm}0.0953$
Е	24	21	148	$0.9855{\pm}0.0179$	$0.1064{\pm}0.0528$
F	23	16	143	$0.9447{\pm}0.0341$	$0.1362{\pm}0.0677$
春季群 spring group	64	36	156	$0.9534{\pm}0.0136$	$0.1481{\pm}0.0713$
秋季群 autumn group	72	50	174	$0.9689{\pm}0.0107$	$0.1632{\pm}0.0783$
中型群 medium form	108	61	83	$0.9465 {\pm} 0.0131$	$0.0051 {\pm} 0.0028$
微型群 dwarf form	28	18	26	$0.8545 {\pm} 0.0676$	$0.0021{\pm}0.0013$
总计 total	136	79	186	$0.9603{\pm}0.0088$	$0.1496 {\pm} 0.0714$

表 5 基于 ND2 序列的鸢乌贼遗传多样性统计数据 5 Descriptive statistics of genetic diversity of *Sthenoteuthis oualaniensis* based on ND2 seque

群和微型群均呈现出很低的核苷酸多样性(比前 两种划分方式及样本整体要低两个数量级),且中 型群的单倍型多样性和核苷酸多样性指数均明显 高于微型群。

3 讨论

基于线粒体 ND2、COI 和 16S rDNA 序列标 记的系统发育和种群结构分析显示,南海鸢乌贼 地理群体之间没有检测到明显的遗传差异,表明 基于形态特征划分的地理种群^[13]并不是遗传学 上的种群(genetic population)。同样,不同季节采 集的样本之间也没有检测到明显的遗传差异,表 明南海鸢乌贼也不支持按季节群体来划分种群, 这与大西洋西南海域阿根廷滑柔鱼(*Illex argentinus*)的研究^[24]类似,传统意义上的两个滑柔鱼 产卵群体并无遗传学差异,不能视为两个种群。

鸢乌贼中型群和微型群在系统发育关系上形成了各自的单系群分支,分子方差分析显示二者之间具有极显著的遗传分化。依据 Freeland^[25]和Wright^[26-27],遗传分化系数 *F*_{ST}>0.25 即表明种群间具备了非常高的遗传分化,本研究中中型群和微型群之间的遗传分化系数 *F*_{ST} 达到 0.94092~0.9899,表明二者之间遗传分化巨大,基因流(0.00255~0.01570)几乎可以忽略不计,这提示南海鸢乌贼两个类群之间已经产生了生殖隔离。

遗传多样性的分析也支持南海鸢乌贼按照表

型类群划分种群的合理性。地理群体和季节群体 的遗传多样性与样本整体无差异,而将中型群和 微型群分别单独计算的遗传多样性(尤其是核苷酸 多样指数)要明显低于整体水平,且两个类群之间 也有差异。这是由于各地理群体和季节群体(以及 样本整体)中均包含了中型群和微型群个体,增加 了个体间的遗传差异度,虚增了遗传多样性水平。

鸢乌贼在世界范围内有非常复杂的类群, Nesis^[7]依据形态、解剖学以及地理分布等特征描述了 3 个主要的类群,即分布于红海和阿拉伯海的"巨型群(giant form)",主要分布于赤道附近海域、背部发光器缺失且个体较小的"微型群"和印度-太平洋广泛分布、具有背部发光器的"中型群"。其中中型群为公认^[28-30]的"典型" 鸢乌贼,其分布范围最广。后有学者发现个体巨大的巨型群实际上只是"典型" 鸾乌贼的一种形态可塑表型 (plastic phenotype)^[31]。而对于不具备背部发光器的微型群,很多学者猜测其可能是有别于典型鸢 乌贼(中型群)的独立物种^[28-29,32]。

本研究基于线粒体 3 个序列标记计算的南海 莺乌贼中型群和微型群之间的遗传距离分别达到 了 14.0%(ND2)、9.6%(COI)和 8.8%(16S rDNA), 远 大于类群内的遗传分化(均小于 1%)。Hebert 等^[33] 认为 COI 的种间差异大于 2%或种间差异大于种 内差异 10 倍时即为不同种, Yu^[34]计算了 140 种软 体动物线粒体基因的遗传距离,发现各个基因的

种内平均距离为 1%~2%, 种间平均距离为 16%~ 26%。若以此为依据、则鸢乌贼中型群和微型群之 间的遗传差异应属于种间水平。实际上这个遗传 差异也达到了同为柔鱼科的滑柔鱼属(Illex)^[35]的 种间差异水平(16%~25%)。Staaf 等^[8]利用线粒体 ND2 序列区分了太平洋中部和东部鸢乌贼的 4 个 遗传学种群,其中发光器缺失的种群(作者定义为 赤道型, equatorial form)与其他几个具有发光器 (典型鸢乌贼)的种群的分歧度最大,遗传距离达 到了14%。本研究中南海鸢乌贼微型群与中型群 ND2 序列遗传距离同样为 14%, 很大程度上表明 这两种表型具备种间水平的遗传差异在鸢乌贼分 布范围内是一个普遍现象。需要指出的是,在南 海这两个类群在地理分布上是重叠的,并不存在 基因交流的物理阻隔,因此可以推断这两个类群 极有可能是具有生殖隔离的两个独立物种。

典型的鸾乌贼(中型群)在生长早期由于背部 发光器发育不明显,与微型群鸾乌贼并无明显的 外形差异,并不能很好地区分^[36-37]。但在成鱼期, 背部发光器的有无是中型群和微型群的一个非常 明显的外形区分特征。这种明显的形态学性状实 质上可作为二者为不同种类的一个印证。在后续 的研究中需要扩大样品的分析范围(如在世界分 布范围内采样),采用更多的分子标记(如核基因 标记)以及分析两个类群在更高阶元中的系统分 类地位等来确认这个结论。

参考文献:

- Dunning M C. A review of the systematics, distribution, and biology of the arrow squid genera *Sthenoteuthis* Verrill, 1880, and *Ornithoteuthis* Okada, 1927 (Cephalopoda: Ommastrephidae)[J]. Smithson Contribution Zoology, 1998, 586(2): 425-433.
- [2] Chen X J, Liu B L, Wang Y G. Cephalopods of the World[M]. Beijing: China Ocean Press, 2009: 312-313. [陈 新军, 刘必林, 王尧耕. 世界头足类[M]. 北京: 海洋出版 社, 2009: 312-313.]
- [3] Wang Y G, Chen X J. The World Ocean Ecomomic Squid Resources and Fisheries[M]. Beijing: China Ocean Press, 2005: 284-295. [王尧耕,陈新军. 世界大洋性经济柔鱼类 资源及其渔业[M]. 北京:海洋出版社, 2005: 284-295.]
- [4] Zhang P, Yang L, Zhang X F, et al. The present status and

prospect on exploitation of tuna and squid fishery resources in South China Sea[J]. South China Fisheries Science, 2010, 6(1): 68-74. [张鹏,杨吝,张旭丰,等. 南海金枪鱼和鸢乌 贼资源开发现状及前景[J]. 南方水产, 2010, 6(1): 68-74.]

- [5] Chen G B, Zhang J, Yu J, et al. Hydroacoustic scattering characteristics and biomass assessment of the purpleback flying squid [*Sthenoteuthis oualaniensis*, (Lesson, 1830)] from the deep water area of the South China Sea[J]. Journal of Applied Ichthyology, 2013, 29(6): 1447-1452.
- [6] Zhang J, Chen G B, Zhang P, et al. Estimation of purpleback flying quid (*Sthenoteuthis oualaniensis*) resource in the central and southern South China Sea based on fisheries acoustics and light-falling net[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2014, 21(4): 822-831. [张俊,陈国宝,张鹏,等. 基 于渔业声学和灯光罩网的南海中南部鸢乌贼资源评估[J]. 中国水产科学, 2014, 21(4): 822-831.]
- [7] Nesis K N. Population structure of oceanic ommastrephids, with particular reference to *Sthenoteuthis oualaniensis*: A review[M]//Recent Advances in Fisheries Biology. Tokyo: Tokai University Press, 1993: 375-383.
- [8] Staaf D J, Ruiz-Cooley R I, Elliger C, et al. Ommastrephid squids *Sthenoteuthis oualaniensis* and *Dosidicus gigas* in the eastern Pacific show convergent biogeographic breaks but contrasting population structures[J]. Marine Ecology Progress Series, 2010, 418: 165-178.
- [9] Yan Y R, Feng B, Lu H S, et al. Fishery biology of purpleback flying squid *Sthenoteuthis oualaniensis* in northern sea areas around Nansha islands in summer[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2012, 43(6): 1177-1186. [颜云榕, 冯波, 卢伙胜,等.南沙群岛北部海域鸢乌贼(*Sthenoteuthis oualaniensis*)夏季渔业生物学研究[J]. 海洋与湖沼, 2012. 43(6): 1177-1186.]
- [10] Zhang P, Yan L, Yang B Z, et al. Population structure of purpleback flying squid (*Sthenoteuthis oualaniensis*) in Nansha area in spring[J]. South China Fisheries Science, 2015, 11(5): 11-19. [张鹏, 晏磊, 杨炳忠, 等. 春季南沙海 域鸾乌贼种群结构特征的研究[J]. 南方水产科学, 2015, 11(5): 11-19.]
- [11] Fan J T, Qiu Y S, Chen Z Z, et al. Morphological difference of the beak between two stocks of *Sthenoteuthis oualaniensis* inhabiting South China Sea[J]. Periodical of Ocean University of China, 2015, 45(10): 42-49. [范江涛, 邱永松, 陈作 志,等. 南海鸢乌贼两个群体间角质颚形态差异分析[J]. 中国海洋大学学报, 2015, 45(10): 42-49.]
- [12] Zhu K, Wang X H, Zhang P, et al. A study on morphological variations and discrimination of medium and dwarf forms of purple flying squid *Sthenoteuthis oualaniensis* in the south-

ern South China Sea[J]. Journal of Tropical Oceanography, 2016, 35(6): 82-88. [朱凯, 王雪辉, 张鹏, 等, 南海南部鸢 乌贼中型群与微型群形态学差异及其判别分析[J]. 热带 海洋学报, 2016, 35(6): 82-88.]

- [13] Yan Y R, Yi M R, Feng B, et al. Morphological variations and discriminant analysis of three different geographic cohorts of *Sthenoteuthis oualaniensis* in the South China Sea[J]. Journal of Guangdong Ocean University, 2015, 35(3): 43-50.
 [颜云榕, 易木荣, 冯波, 等. 南海鸢乌贼 3 个地理群体形态差异与判别分析[J]. 广东海洋大学学报, 2015, 35(3): 43-50.]
- [14] Yang D K. The resources and its exploitation and utilization of two species of squid[J]. Journal of Shanghai Fisheries University, 2002, 11(2): 176-179. [杨德康. 两种鱿鱼资源 和其开发利用[J]. 上海水产大学学报, 2002, 11(2): 176-179.]
- [15] Okutani T, Tung I. Reviews of biology of commercially important squids in Japanese and adjacent waters. I. Symplectoteuthis oualaniensis (Lesson)[J]. Veliger, 1978, 21(1): 87-94.
- [16] Hall T A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT[J]. Nucleic Acids Symposium Series, 1999, 41: 95-98.
- [17] Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets[J]. Molecular Biology Evolution, 2016, 33(7): 1870-1874.
- [18] Edgar R C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput[J]. Nucleic Acids Research, 2004, 32(5): 1792-1797.
- [19] Tamura K, Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees[J]. Molecular Biology Evolution, 1993, 10(3): 512-526.
- [20] Tamura K. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+C-content biases[J]. Molecular Biology Evolution, 1992, 9(4): 678-687.
- [21] Excoffier L, Lischer H L. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows[J]. Molecular Ecology Resource, 2010, 10(3): 564-567.
- [22] Excoffier L, Smouse P E, Quattro J M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data[J]. Genetics, 1992, 131(2): 479-491.
- [23] Librado P, Rozas J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data[J]. Bioinformatics, 2009, 25(11): 1451-1452.

- [24] Roldán M I, Planella L, Heras S, et al. Genetic analyses of two spawning stocks of the short-finned squid (*Illex argentinus*) using nuclear and mitochondrial data[J]. Comptes Rendus Biologies, 2014, 337(9): 503-512.
- [25] Freeland J R. Molecular Ecology[M]. Chichester: John Wiley & Sons Ltd., 2005: 112-116.
- [26] Wright S. The genetical structure of populations[J]. Annals of Human Genetics, 1949, 15(1): 323-354.
- [27] Wright S. Evolution and the Genetics of Population: Variability within and among Natural Population[M]. Chicago: University of Chicago Press, 1978: 79-103.
- [28] Wormuth J H. The Biogeography and Numerical Taxonomy of the Oegopsid Squid Family Ommastrephidae in the Pacific Ocean[M]. California: University of California Press, 1976.
- [29] Young R E. A brief review of the biology of the oceanic squid, *Symplectoteuthis oualaniensis* (Lesson)[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry, 1975, 52(1): 141-143.
- [30] Young R E, Michael V. Sthenoteuthis oualaniensis (Lesson, 1830). Version 10 November 2012 (under construction)[Z]. http://tolweb.org/Sthenoteuthis oualaniensis/77447.
- [31] Snyder R. Aspects of the biology of the giant form of Sthenoteuthis oualaniensis (Cephalopoda: Ommastrephidae) from the Arabian Sea[J]. Journal of Molluscan Studies, 1998, 64(1): 21-34.
- [32] Clarke M R. Large light organs on the dorsal surface of the squids Ommastrephes pteropus, 'Symplectoteuthis oualaniensis' and 'Dosidicus gigas'[J]. Journal of Molluscan Studies, 1965, 36(5): 319-321.
- [33] Hebert P D N, Cywinska A, Ball S L. Biological identifications through DNA barcodes[J]. Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences, 2003, 270(1512): 313-321.
- [34] Yu H, Kong L, Li Q. Evaluation of the efficacy of twelve mitochondrial protein-coding genes as barcodes for mollusk DNA barcoding[J]. Mitochondrial DNA Part A, 2016, 27(2): 1336-1339.
- [35] Carvalho G R, Thompson A, Stoner A L. Genetic diversity and population differentiation of the shortfin squid *Illex argentinus* in the south-west Atlantic[J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 1992, 158(1): 105-121.
- [36] Nesis K. Population structure of the squid Sthenoteuthis oualaniensis (Lesson, 1830) in the tropical West Pacific[J]. Trudy Instituta Okeanologii Akademiia Nauk SSSR, 1977, 107: 15-29.
- [37] Roeleveld M A C, Lipinski M. The giant squid Architeuthis in southern African waters[J]. Journal of Zoology, 2009, 224(3): 431-477.

Genetic differentiation of the purpleback flying squid, *Sthenoteuthis oualaniensis*, in the South China Sea: population or species divergence

LI Min, ZHANG Peng, ZHANG Jun, ZHANG Kui, CHEN Zuozhi

Key Laboratory of Open-Sea Fishery Development, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China

Abstract: In the present study, the population differentiation of the purpleback flying squid (Sthenoteuthis oualaniensis) in the South China Sea was examined based on mitochondrial ND2, COI, and 16S rDNA sequences, using samples collected between September 2012 and September 2015. Phylogenetic analysis revealed two significantly divergent monophyletic groups corresponding to the "medium form" and the "dwarf form, " but no geographical lineages corresponding to the sampling localities or seasonal groups were found. The Analysis of Molecular Variance also revealed significant genetic differentiation between the "medium form" and the "dwarf form" ($F_{ST}=0.94092-0.9899$, P<0.0001), while no genetic variance between either geographic populations or seasonal groups was found. The genetic diversity analysis showed that both the "medium form" and the "dwarf form" of S. oualaniensis in the South China Sea were characterized by high haplotype diversity (0.9465 and 0.8545) and low nucleotide diversity (0.0051 and 0.0021). The genetic distance between the 'medium form' and the "dwarf form" based on ND2, COI, and 16S sequences were 14.0%, 9.6%, and 8.8%, respectively. The genetic distances between the two forms were considerably larger than the genetic distances within each of the two forms (<1%). It was demonstrated that two divergent populations of S. oualaniensis were sympatrically distributed in the South China Sea, i.e. the "medium form" and the "dwarf form." The genetic differentiation between these two populations was similar to that among separate species within Ommastrephidae, which indicated that the two morphologically distinct forms of the purpleback flying squid, namely the "medium form" (middle sized, with a photophore) and the "dwarf form" (small sized, without a photophore), are two distinct species.

Key words: *Sthenoteuthis oualaniensis*; population genetic structure; genetic diversity; mitochondrial DNA sequence; the South China Sea

Corresponding author: CHEN Zuozhi. E-mail: zzchen2000@163.com