

文章编号: 1004-7271(2007)03-0201-06

长江口日本鳗鲡群体遗传多样性 RAPD 初步分析

龚小玲, 李思发, 王成辉

(上海水产大学生命科学与技术学院, 上海水产大学农业部水产种质资源与
养殖生态重点开放实验室, 上海 200090)

摘要:对2005年采集自长江口地区4个采样点、5批、共10尾性成熟前成鳗、82尾玻璃鳗的日本鳗鲡样本的遗传多样性进行了RAPD分析。在51条随机引物中筛选出具有稳定扩增、条带清晰的多态性引物16条, 16条引物共检测到132个位点, 其中多态位点114个(86.36%)。五个采样群体各自的平均杂合度(H_e) 在0.2053~0.3150之间, 平均基因多样性指数(H_o) 在0.2974~0.4526之间; 采样群体两两间的遗传分化指数 F_{ST} 在0.0508~0.1524之间。群体内遗传变异和群体间遗传变异对群体总遗传变异的贡献率分别为79.18%和20.82%; Nei的遗传距离在0.0593~0.1425之间; 在玻璃鳗采样群体间未发现遗传差异同采样地点及月份有何显著关系, 显示它们可能同属一个大混合群体。而遗传距离、遗传分化指数及NJ树分析结果一致表明: 成鳗和玻璃鳗之间可能存在相当的遗传距离和遗传分化。

关键词:日本鳗鲡; 长江口; RAPD; 遗传多样性; 遗传距离

中图分类号: S 917 文献标识码: A

Primary study on the genetic diversity of Japanese eel (*Anguilla japonica*) from the Yangtze River Estuary by RAPD analysis

GONG Xiao-ling, LI Si-fa, WANG Cheng-hui

(College of Aqua-life Science and Technology, Key Laboratory of Aquatic Genetic Resources and Aquacultural
Ecosystem Certificated by the Ministry of Agriculture, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract: Random amplified polymorphic DNA method was used to investigate the genetic diversity of *Anguilla japonica* including five samplings collected from 4 locations, totally 92 individuals (10 premature adult eels, 82 glass eels) in 2005 from the Yangtze River Estuary. 51 RAPD primers were synthesized and 16 primers were selected and used. A total of 132 loci were amplified, of which 114 loci (86.36%) were polymorphic. Average heterozygosity (H_e) and genetic diversity index (H_o) of five samplings by Shannon index varied from 0.2053 to 0.3150, and 0.2974 to 0.4526 respectively. Fixation Index F_{ST} between two samplings varied from 0.0508 to 0.1524. Partition of total genetic variation indicated that 79.12% was contributed within populations and 20.82% among samplings. The Nei's genetic distances of five samplings varied from 0.0593

收稿日期: 2007-01-23

基金项目: 上海市重大科技攻关项目(04DZ19306); 上海市重点学科建设项目(Y1101)

作者简介: 龚小玲(1972-), 女, 湖北蕲春人, 副教授, 在读博士, 主要从事鱼类学方面的研究。E-mail: xlgong@shfu.edu.cn

通讯作者: 李思发, Tel: 021-65710333, E-mail: sfli@shfu.edu.cn

to 0.142 5. There is no significant relationship between the genetic variation of samplings of glass eel and the sampling time or the sampling area. It indicates the all studied glass eels might be originated from one big complex population. But the results from genetic distance, Fixation Index F_{st} and NJ tree all showed, a rather high difference in genetic distance and genetic diversity could be exist between the premature adult eels and glass eels.

Key words: *Anguilla japonica*; Yangtze River Estuary; RAPD; genetic diversity; genetic distance

日本鳗鲡 (*Anguilla japonica* Temm. et Schl), 隶属于鳗鲡目、鳗鲡科、鳗鲡属, 又称白鳗、鳗鱼、河鳗等, 系海洋与江河间洄游鱼类。日本鳗鲡的生活史复杂, 从出生到死亡, 经过卵期 (Egg stage)、柳叶鳗 (leptocephalus)、玻璃鳗 (Glass eel)、鳗苗 (Elver)、性成熟前成鳗 (Yellow eel) 及性成熟 (Silver eel) 等 6 个不同的发育阶段。一般认为, 在它的生活史中, 要经历溯河和降海两次长距离的洄游, 两次经过海河 (江) 交界处。日本鳗鲡营养丰富, 味道鲜美, 天然苗种和人工养殖主要分布在太平洋西部的一些亚洲地区^[1-2], 是这些地区目前人工养殖和出口创汇的重要水产品之一。到目前为止, 日本鳗鲡规模化的人工育苗依然没有成功, 其苗种全靠天然捕捞, 这就使人们对其自然资源、种质、遗传分化情况十分关心, 鳗鲡专家指出“世界天然鳗鱼资源急速减少, 意味着鳗苗产量剧降, 值得重视”^[3]。因此开展日本鳗鲡种质资源的研究, 提出合理的开发利用的方案是迫在眉睫的工作。中国是世界上日本鳗鲡的主要产苗国, 占全世界产量的一半以上, 而长江口鳗苗产量又占全国的六成以上, 因而, 通过对长江口日本鳗鲡遗传多样性的分析, 可以较好地掌握目前日本鳗鲡的资源状况。

随机扩增多态性 DNA (random amplified polymorphic of DNA, RAPD) 是一种高效的检测 DNA 多态性的方法, 具有快速、灵敏、简便等特点, 已被广泛应用于遗传多样性、遗传分化等的检测^[4-5], 本文采用 RAPD 技术对长江口采集到的日本鳗鲡的玻璃鳗和成鳗群体进行遗传多样性比较分析, 并探讨它们之间的遗传相似性和分化程度, 以期揭示该地区日本鳗鲡的资源特色。

1 材料和方法

1.1 实验材料

2005 年 2 月至 10 月间, 玻璃鳗样本分别采集于长兴岛、启东及海安 (2 批), 成鳗样本采集于九段沙 (表 1, 图 1)。玻璃鳗全长在 5.5 ~ 6.2 cm, 成鳗全长在 42 ~ 50 cm。鲜活鱼用 95% 酒精固定后备用。实验用 10 碱基随机引物购自上海生物工程有限公司。

表 1 日本鳗鲡样本采集的时间和地点

Tab. 1 The sampling times and locations of *Anguilla japonica*

采样地	长兴岛 (Ch)	启东 (Qi)	海安 I (Ha I)	海安 II (Ha II)	九段沙 (Ji)
规格	玻璃鳗	玻璃鳗	玻璃鳗	玻璃鳗	成鳗
数量 (尾)	20	20	20	22	10
采样时间	2005/2/29	2005/3/16	2005/4/1	2005/6/21	2005/8/15

1.2 DNA 的提取和 PCR 扩增

基因组 DNA 提取和 PCR 扩增反应参照 Sambroo 等^[6]描述的方法。所用的 RAPD 引物序列购自上海生工。

1.3 数据分析

电泳图谱中的每一条带记为一个位点, 某个体该位点出现条带的记为 1, 未出现条带的记为 0, 建立原始数据矩阵。

在 Popgen3.2 软件中计算下列遗传参数:

(1)多态位点比例(P);(2)Shannon 遗传多样性信息指数^[7]; (3)据 Nei^[8]的方法计算群体间的遗传相似度(I)和遗传距离(D)

由 ARLEQUIN3.01 软件进行群体间的遗传变异的分子方差分析(AMOVA),分析各群体的遗传分化指数 F_{ST} 以及群体内的位点平均杂合度 (H_c),根据 Nei 遗传距离,用 Mega3.1 软件中的 NJ 程序构建不同群体间的系统关系树。



图 1 日本鳗鲡采样群体的地理分布

Fig.1 Sampling locations of *Anguilla japonica*

2 结果

2.1 RAPD 扩增结果

从 51 条引物中筛选出 16 条扩增效果稳定、片段丰富的多态性引物用于全部样本的 RAPD 扩增。16 条引物在日本鳗鲡五个采样群体中共扩增出 132 条清晰、稳定的条带,平均每条引物为 8.25 条,扩增出的条带绝大多数在 250 bp ~ 2 200 bp 之间, S97 引物扩增的条带最多(11 条), S73 最少(6 条)。图 2 为 S66 引物的部分个体扩增图谱。

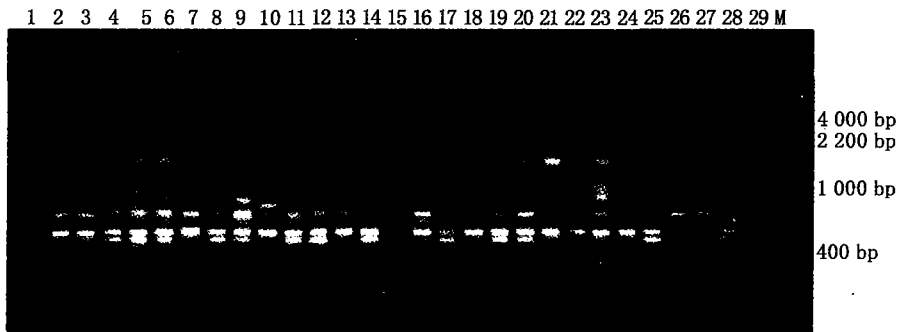


图 2 引物 S66 对日本鳗鲡五采样群体的 RAPD 电泳图谱

Fig.2 Amplification of genomic DNA with primer S66 from 5 samplings of *Anguilla japonica*
群体 Ch:1-5, Ha I :6-10, Ha II :11-15, Ji:16-18, Qi:19-23, M:200 bp ladder

2.2 日本鳗鲡群体的遗传多样性

在 132 个扩增位点中,检出多态位点 114 个,占总位点的 86.36%。多态性位点的比率以长兴岛群体最高(72.73%),九段沙群体最低(49.20%)。五个采样群体各自的平均杂合度 (H_c) 在 0.2053 ~ 0.3150 之间,其中以长兴岛的最高,九段沙的最低(表 2)。长兴岛(Ch)、启东(Qi)、海安 I(Ha I)、海安 II(Ha II)、九段沙(Ji)等采样群体的不同引物平均基因多样性指数 (H_o),分别在 0.1847 ~ 0.6695、0.0672 ~ 0.5073、0.0751 ~ 0.5839、0.0701 ~ 0.6140、0.1224 ~ 0.6264 之间,有较为明显的差异性;而同一引物在不同的采样群体间的 H_o 也有着明显的差异。

表 2 日本鳗鲡五个采样群体的遗传多样性分析
Tab.2 Analysis of genetic diversity in five samplings of *Anguilla japonica*

群体	个体数	检测到的多态位点数	多态位点比例(% , P)	平均杂合度(H_c)	平均基因多样性指数(H_o)
Ch	20	96	72.73	0.3150	0.4526
Qi	20	69	52.57	0.2215	0.3198
Ha I	20	76	57.58	0.2498	0.3591
Ha II	22	81	61.36	0.2563	0.3720
Ji	10	65	49.204	0.2053	0.2974
合计	92	114	86.36		

对包括玻璃鳗 4 采样群体和成鳗 1 群体的总样本来说, 群体内差异和群体间差异对鳗鱼总遗传多样性的贡献大小的分析结果(表 3)表明, 采样群体内差异的贡献率为 79.18%, 采样群体间差异的贡献率为 20.82%; 如仅对玻璃鳗 4 采样群体的样本作分析, 则采样群体内差异对鳗鱼总遗传多样性的贡献率为 83.44%, 采样群体间差异的贡献率为 16.56%。这表明, 玻璃鳗和成鳗在遗传上可能存在差异。

表 3 日本鳗鲡采样群体内和群体间遗传多样性分布

Tab. 3 The distribution of genetic diversity within and among samplings of *Anguilla japonica*

引物	平均基因多样性指数(H_o)					群体内平均多样性指数(H_{pop})	总群体平均基因多样性指数(H_{sp})	H_{pop}/H_{sp}	$(H_{sp} - H_{pop})/H_{sp}$
	Ch	Qi	Ha I	Ha II	Ji				
S53	0.609 7	0.507 3	0.465 0	0.473 2	0.302 5	0.471 5	0.558 4	0.844 4	0.155 6
S55	0.526 7	0.474 0	0.557 4	0.542 5	0.210 1	0.462 1	0.574 5	0.804 4	0.195 6
S60	0.377 9	0.245 8	0.531 6	0.527 1	0.482 2	0.432 9	0.494 0	0.876 4	0.123 6
S64	0.336 6	0.308 9	0.372 3	0.389 2	0.359 1	0.353 2	0.416 6	0.847 9	0.152 1
S66	0.184 8	0.164 2	0.175 3	0.171 3	0.307 5	0.200 6	0.341 8	0.587 0	0.413 0
S67	0.535 1	0.416 1	0.520 1	0.592 9	0.493 3	0.511 5	0.601 0	0.851 1	0.148 9
S73	0.609 5	0.501 7	0.325 2	0.614 0	0.626 4	0.535 4	0.568 8	0.941 2	0.058 8
S76	0.534 6	0.207 9	0.422 8	0.500 2	0.192 2	0.371 5	0.481 7	0.771 3	0.228 7
S82	0.532 4	0.424 7	0.075 1	0.365 5	0.234 6	0.326 5	0.469 9	0.694 7	0.305 3
S83	0.425 1	0.220 6	0.308 0	0.134 0	0.153 0	0.248 1	0.362 7	0.684 1	0.315 9
S86	0.387 7	0.413 3	0.343 0	0.275 4	0.179 3	0.319 7	0.468 5	0.682 5	0.317 5
S90	0.220 6	0.067 2	0.221 2	0.070 1	0.266 1	0.169 0	0.220 8	0.765 6	0.234 4
S91	0.188 5	0.142 0	0.274 9	0.161 5	0.122 4	0.177 9	0.268 5	0.662 4	0.337 6
S92	0.669 5	0.360 3	0.583 9	0.418 8	0.272 8	0.461 1	0.565 2	0.815 7	0.184 3
S95	0.527 3	0.306 1	0.244 7	0.310 1	0.223 9	0.322 4	0.422 0	0.764 0	0.236 0
S97	0.597 2	0.412 5	0.413 1	0.516 5	0.457 6	0.479 4	0.534 5	0.896 9	0.103 1
平均值	0.452 6	0.319 8	0.359 1	0.372 0	0.297 4	0.360 2	0.454 9	0.791 8	0.208 2

2.3 遗传相似性和遗传距离

长江口地区日本鳗鲡各采样群体的遗传相似度和遗传距离见表 4。九段沙成鳗采样群体与长兴岛、启东、海安 I、海安 II 玻璃鳗采样群体之间的遗传距离分别为 0.124 8、0.105 2、0.142 5、0.090 5, 平均 0.115 8; 而长兴岛、启东、海安 I、海安 II 4 个玻璃鳗采样群体两两间的遗传距离平均为 0.080 1; 前者约为后者的 1.45 倍。

表 4 日本鳗鲡五采样群体 Nei's 的遗传相似度 I (对角线上方) 和遗传距离 D (对角线下方)Tab. 4 Nei's genetic identity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal) of five samplings of *Anguilla japonica*

群体	Ch	Qi	Ha I	Ha II	Ji
Ch		0.898 4	0.926 6	0.925 4	0.882 7
Qi	0.107 1		0.924 1	0.942 4	0.900 2
Ha I	0.076 3	0.078 9		0.921 7	0.867 2
Ha II	0.077 5	0.059 3	0.081 5		0.913 5
Ji	0.124 8	0.105 2	0.142 5	0.090 5	

2.4 遗传分化指数 F_{ST}

AMOVA 分析表明, 长兴岛、启东、海安、海安 II 和九段沙的采样群体内遗传分化指数 (F_{ST}) 分别为 0.139 5、0.149 0、0.148 1、0.148 9、0.152 9, 差异极显著 ($P < 0.01$)。而采样群体两两间的遗传分化指数 (F_{ST}) 在 0.050 8 ~ 0.152 4 之间(表 5)。海安—九段沙间的遗传分化最大 ($F_{ST} = 0.152 4$), 启东—海安间的分化程度最低 ($F_{ST} = 0.050 8$)。九段沙成鳗与长兴岛、启东、海安 I、海安 II 4 个玻璃鳗采样群体之间的遗传分化指数平均值为 0.1165, 而 4 个玻璃鳗采样群体间的遗传分化指数平均值为 0.072 6,

前者约为后者的 1.60 倍。

表 5 日本鳗鲡五采样群体间的遗传分化指数
Tab.5 The F_{ST} indices of five samplings of *Anguilla japonica*

群体	Ch	Q i	Ha I	Ha II	Ji
Ch	0.000 0				
Q i	0.108 0	0.000 0			
Ha I	0.064 3	0.067 2	0.000 0		
Ha II	0.058 7	0.050 8	0.086 5	0.000 0	
Ji	0.090 7	0.133 3	0.152 4	0.089 5	0.000 0

2.5 五个采样群体的 NJ 树

依据对长江口地区日本鳗鲡采样群体的 RAPD 数据构建 NJ 系统树 (图 3)。长兴岛与海安 I 采样群体聚为一支,然后依次与启东、海安 II 采样群体聚为一大支;而九段沙采样群体 (成鳗) 单独聚为一支。

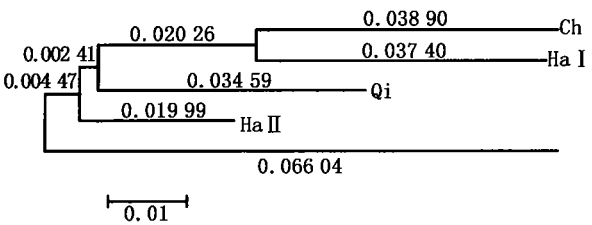


图 3 日本鳗鲡五个采样群体的 NJ 树

Fig.3 The NJ tree of five samplings of *Anguilla japonica*

3 讨论

3.1 长江口日本鳗鲡的遗传多态性丰富

由 16 条随机引物,在长江口日本鳗鲡 5 个采样群体,共 92 尾个体中,检测到 132 个位点,其中多态位点 114 个,比例为 86.36%。我们未能找到日本鳗鲡或其它鳗鲡的相关数值,无法在鳗鲡的种间予以比较。但如同其它鱼类的有关数据作一比较,则发现低于黄海、东海小黄鱼的 91.03%^[9],高于河北省黄骅市附近海域梭鱼的 85.71%^[10]、黄海真鲷的 62.6%^[11]。由于研究对象的不同,作者和技术的差异,虽然不能直接用来比较多态性的高低,但可显示长江口地区日本鳗鲡目前处在较为丰富的遗传多样性水平上。作者认为,这可能与日本鳗鲡自然产卵、产卵后亲鱼死亡、自然种群分布广、人为干扰因素较少等相关。

3.2 长江口玻璃鳗不同采样群体可能同属一个大混合群体

长兴岛、启东、海安 I、海安 II 4 个采样群体,均为 2005 年采集的玻璃鳗样本,它们之间的遗传相似度都比较高(0.898 4~0.942 4),在 NJ 树上聚为一大支(图 3)。但 2005 年 4 月和 6 月在海安分别采集的 2 批玻璃鳗样本,它们形态特征一致、体长均在 5.5~6.2 cm,并没有紧紧聚在一起,而是前者与长兴岛采样群体聚为一小支。另外长兴岛、启东与海安(2 批)三地四批玻璃鳗样本采样时间分别是 2005 年的 2 月 29 日、3 月 16 日、4 月 1 日、6 月 21 日,它们的在 NJ 树上的聚类关系与采集时间也无紧密的关联,但最后一批样本(6 月 21 日)在四个玻璃鳗聚类支上的位于最外一支。由此看来,可以认为,长江口玻璃鳗 4 个采样群体的遗传距离同采样地点及月份没有显著的相关,它们可能同属一个大混合群体。它们从遥远的产卵场到达长江口的不同地点,或者在不同时间到达同一地点(如海安的两批样本前后相差 2 个多月),可能是由于受到海流作用强弱的不同,或者产卵时间上的差异造成的。

3.3 长江口成鳗与玻璃鳗采样群体间的关系

本研究发现,第一,九段沙成鳗采样群体与长兴岛、启东、海安 I、海安 II 玻璃鳗采样群体之间的两两遗传距离的平均值(0.115 8)是四个玻璃鳗采样群体两两间遗传距离平均值(0.080 1)的 1.45 倍,而遗传分化指数相差达 1.60 倍。第二,当把 4 个玻璃鳗样本与 1 个成鳗样本一并统计时,总遗传变异的贡献率有 79.18% 来自采样群体内,20.82% 来自采样群体间;但当只对 4 个玻璃鳗样本予以统计时,则是总遗传变异的贡献率有 83.44% 来自采样群体内,提高了 5.4 个百分点,16.56% 来自采样群体间,

降低了7.9个百分点。第三,在NJ树上,四个玻璃鳗采样群体聚为一大支,而成鳗样本单独成一支。以上结果从多方面表明,这批成鳗样本和4批玻璃鳗样本在遗传上可能存在相当的遗传距离和遗传分化。

参考文献:

- [1] Tsukamoto K. Discovery of the spawning area for Japanese eel[J]. *Nature*, 1992, 356:789 - 791.
- [2] Cheng P W, Tzeng W N. Timing of metamorphosis and estuarine arrival across the dispersal range of the Japanese eel *Anguilla japonica*[J]. *Mar Ecol Prog Ser*, 1996, 131:87 - 96.
- [3] 赵荣兴,夏连军(译). 日本鳗鲡(*Anguilla japonica* Temminck et Schlegel)鳗苗资源变动之谜[J]. *现代渔业信息*, 2005, 20(8):11 - 14.
- [4] 丁诗华,黄丽英,张海琪,等. 大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)岱衢洋选育群体和官井洋养殖群体的遗传差异分析[J]. *海洋与湖沼*, 2006, 37(1):41 - 46.
- [5] 申雪艳,宫庆礼,雷霖霖,等. 进口大菱鲆 *Scophthalmus maximus* L. 苗种的遗传结构分析[J]. *海洋与湖沼*, 2004, 35(4):332 - 430.
- [6] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd edn.) [M]. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [7] Wachira F N, Waugh R, Hackell C A, et al. Delection of genetic diversity in tea (*Camellia sinensis*) using RAPD markers[J]. *Genome*, 1995, 38:201 - 210.
- [8] Nei M. Genetic distance between populations[J]. *Am Nat*, 1972, 106:283 - 292.
- [9] 蒙子宁,庄志猛,金显仕,等. 黄海和东海小黄鱼遗传多样性的 RAPD 分析[J]. *生物多样性*, 2003, 11(3):197 - 203.
- [10] 权洁霞,邓景耀. 梭鱼人工养殖群体与自然群体的随机扩增多态 DNA (RAPD) 分析[J]. *海洋学报*, 2000, 22(5):82 - 87.
- [11] 孟宪红,孔杰. 真鲷自然群体和人工繁殖群体的遗传多样性[J]. *生物多样性*, 2000, 8(3):248 - 252.