

日本鳗鲡 (*Anguilla japonica*) 和欧洲鳗鲡 (*A. anguilla*) 的微卫星差异*

梁俊 李道季 卢莉琼[†]

(华东师范大学河口海岸国家重点实验室 上海 200062)

[†](华东师范大学环境科学与技术系 上海 200062)

提要 采用 PCR 扩增单位点微卫星的方法研究了日本鳗鲡 (*Anguilla japonica*) 和欧洲鳗鲡 (*A. anguilla*) 的遗传差异。结果表明,微卫星等位基因数目分布范围为 8—26, 35 组被试 (5 个分类单元各 7 个位点) 的显著性检验的结果表明其杂合性显著缺乏 ($P < 0.01$), 日本鳗鲡的 4 个亚种群的所有微卫星位点均偏离哈-温平衡, 对日本鳗鲡种群分化进行的正合检验结果也否定了种内个体随机分布的假设。 F_{ST} 值为 0.0098 ($P = 0.00048$) 揭示了日本鳗鲡亚种群内存在较弱但显著的遗传分化。各分类单元间的 F_{ST} 及 R_{ST} 逐一对应矩阵显示了日本鳗鲡与欧洲鳗鲡两个远缘种之间存在显著差异。计算 Goldstein 的遗传距离并由此推算出两个种的分化时间约为 200 多万年。

关键词 微卫星, 遗传结构, 遗传距离, 日本鳗鲡, 欧洲鳗鲡

中图分类号 Q75

鳗鲡 (genus *Anguilla* Shaw, family Anguillidae) 广泛分布于全球各大洋及大河口, 作为一类溯河降海洄游鱼类, 其生活史中包括了深海中产卵、孵化, 然后至淡水湖泊中成长的过程。至于其分布, 鳗鲡在西太平洋及北大西洋的分布及扩散过程被认为与海洋中的亚热带环流有关 (Ege, 1939; Tesch, 1977)。日本鳗鲡在东亚各国是一种重要的渔业资源种。由于缺乏对鳗鲡生理 (徐斌等, 1997)、生态特性及影响其遗传结构的自然因子的了解, 至今仍未建立完善的人工养殖系统。

作者试图从遗传学角度提供关于鳗鲡的遗传结构、进化起源方面的证据。依据 Schmidt (1925) 提出的关于欧洲鳗鲡的随机交配假设: 所有的欧洲鳗鲡都洄游到 Sargasso 海中进行繁殖, 因此就形成了一个单一的、随机交配的种群。海洋调查发现, 日本鳗鲡的产卵地都位于马里亚那岛西部的北赤道流海区附近 (Tsukamoto, 1992), 这就暗示日本鳗鲡在整个西太平洋产卵地是单一的, 由此形成了一个随机交配的种群。这一假设引起许多怀疑, 但是等位酶证据 (DeLigny *et al.*, 1973; Comparini *et al.*, 1980; Chan *et al.*, 1997) 和 D-loop

* 国家重点基础研究规划项目 (973) “中国典型河口-近岸陆海相互作用及其环境效应” 资助, 2002CB412405 号; 上海市教委“曙光计划” 项目, 02SG22 号; 上海市重点学科资助项目及高等学校骨干教师资助计划资助。梁俊, 男, 出生于 1978 年 5 月, 硕士, E-mail: junliang@public4.sta.net.cn

收稿日期: 2002-10-16, 收修改稿日期: 2003-03-10

DNA 序列证据(Avise *et al.*, 1986; Lintas *et al.*, 1998)等均未能发现鳗鲡种群内存在遗传差异。直到本世纪初, Wirth 等(2001)运用微卫星遗传标记对欧洲沿岸 13 处河口的 470 条鳗鲡样本进行基因多态性分析, 发现所调查的欧洲鳗鲡种群间存在着明显的变异, 这种变异尽管很小, 但还是证明了遗传结构的存在。

由于微卫星(microsatellite)标记符合孟德尔共显性遗传特征, 因此它所代表的等位基因差异可以通过纯合、杂合的方式显现, 而且由于 DNA 滑动引起了微卫星重复片段的增加或减少, 导致了其较高的多态性(Tautz, 1993), 因此其差异也可以用重复子的多少来衡量。正是微卫星标记具有诸多优点(Nauta *et al.*, 1996; Feldman *et al.*, 1997), 人们一般都选择其作为标记来研究种群的遗传变异(徐鹏等, 2001)。作者采用微卫星标记作为遗传标记在检测日本鳗鲡遗传变异的基础上再次检验随机交配假设, 并进一步探究日本鳗鲡和欧洲鳗鲡的进化关系。

1 材料与方法

1.1 采样

2002 年春季在西太平洋沿岸各河口——韩江口(121°37'E, 31°30'N)(JAP-HAN)、闽江口(119°75'E, 26°05'N)(JAP-MIN)、长江口(116°88'E, 23°12'N)(JAP-CHA)、日本九州岛沿海(130°03'E, 31°67'N)(JAP-KAG)采集了 160 尾活体稚鳗。2002 年 3 月在法国卢瓦尔(Loire)河口(2°08'W, 47°13'N)(ANG-LOI)采集了 40 尾欧鳗幼体。样品均于 -20℃ 保存。

1.2 DNA 提取

采用标准的蛋白酶 K 裂解法, 加酚/氯仿/异戊醇抽提(Sambrook *et al.*, 1989), 从 200 尾稚鳗个体中提取基因组 DNA、无水乙醇沉淀 DNA、真空干燥, 最后溶解于 TE 缓冲液(pH = 8.0)。经紫外分光光度法定量后置于 4℃ 冰箱中备用。

1.3 微卫星位点的 PCR 扩增、检测及分析

为研究鳗鲡 5 个分类单元的遗传结构及进化关系, 选用 7 个微卫星位点(Aro 054, Aro 095, Aro 121, Ang 063, Ang 101, Ang 151, Ang 114)进行扩增。这些位点及其两边保守序列均获取自 Genbank(序列号 AF237896—AF237902)。

在进行检测之前曾经采用各种方法(Touch Down PCR, 温度梯度 PCR 等)来优化反应条件, 以期获得高浓度的产物及尽可能少的杂带(stutter bands)。反应退火温度范围从 52℃—54℃(表 1)。反应体系包括: 0.3μg 基因组 DNA 作为模板、2.5U Taq 酶、各 0.5μmol/L(终浓度, 下同)引物、200μmol/L 的 4 × dNTPs、1.5—2.0mmol/L MgCl₂(表 1)、10 × PCR 缓冲液(包括: 100mmol/L KCl、80mmol/L (NH₄)₂SO₄、100 mmol/L Tris·Cl, NP-40, pH = 9.0), 以去离子水补足总体积 50μl。在 MJ PTC-220 热循环仪上进行 PCR 扩增, 条件如下: 95℃ 预变性 10min; 35 次循环过程(94℃ 变性 30s, 适当温度(表 1)下退火 30s, 72℃ 延伸 30s); 最后再延伸 5min 使反应完全。反应结束后在 2.5μl PCR 产物中加入 2.5μl 变性上样缓冲液(含 50mmol/L EDTA、95% 去离子甲酰胺、0.25% 溴酚兰、0.25% 二甲苯青 FF)。用 8% 变性(8mol/L 脲)聚丙烯酰胺凝胶(PAGE)(20cm 长, 12cm 宽)电泳分离不同长度的微卫星片段, 每一块凝胶中均加入两个 DNA Marker 作指示。5V/cm 恒压电泳 12h 后, 用银染及 0.5μg/ml EB 染色(结果证明 EB 染色效果并不逊于银染, 且操作简单易行)观察片段长度。采用 Bio-Rad 公司生产的凝胶成像系统获取的电泳图像, 以 Quantity One 图像分析软

件(Bio-Rad Laboratories, Inc.)对结果进行分析。微卫星片段的长度及重复子个数是参照邻近的 DNA Marker (Fermentas Inc.)的迁移率进行计算。

表 1 PCR 反应的退火温度及 Mg^{2+} 浓度

Tab.1 PCR conditions about the annealing temperature and the concentration of Mg^{2+}

项目	Aro 054	Aro 095	Aro 121	Ang 063	Ang 101	Ang 151	Ang 114
退火温度(°C)	52.0	52.5	56.4	50.3	51.1	54.0	53.0
Mg^{2+} 浓度(mmol/L)	1.25	1.0	1.5	2.0	2.0	1.75	1.5

每一个分类单元各位点的等位基因频率及观察杂合度(observed heterozygosities)结果都是用 GENEPOP (Raymond *et al.*, 1995)软件(Version 3.3)计算的。同样用这一软件还通过马尔可夫链过程(Markov-chain random algorithm)(Guo *et al.*, 1992)检测了哈-温平衡(Hardy-Weinberg equilibrium)。检测种群分化是在逐步突变模型(stepwise mutation model)下进行的, F_{ST} (Weir *et al.*, 1984)被用于估测各分类单元之间的分化。此外,计算过程中还采取了 Jackknifing 法进行了反复抽样以估测计算结果的标准差。运用 FSTAT(Goudet, 1995)软件(Version 2.9.3.2)进行正合检验,逐一比较了各分类单元之间等位基因的分布差异。作者对 Goldstein 等(1995)遗传距离 $D1$ 和各分类单元栖息地的空间距离进行了 Mantel 检验(Mantel, 1967)。为探究欧洲鳗鲡与日本鳗鲡之间的进化关系,还用 Microsat 软件(Version 1.5b)(<http://hpgl.stanford.edu/projects/microsat>)计算出了两个远缘关系种的分化时间。最后用 TreeView(Page, 1996)软件(Version 1.6.6)绘制了各分类单元的系统发生树。

2 结果与讨论

日本鳗鲡 4 个亚种群各微卫星位点的等位基因观察数目差异很大,且在所有 35 个被试中均表现为显著的杂合子不足($P < 0.01$)(表 2)。运用马尔可夫链过程(10000 iteration)对日本鳗鲡 4 个亚种群进行的哈-温平衡检测,经 Bonferroni(Rice, 1989)校正($\alpha = 0.05$, $k = 13$),结果显示所有的被试均显著偏离哈-温平衡。显然这一结果否定了 Schmidt 的随机交配假设,而且为考察种群分化所进行正合检验的结果同样也否定了种内个体随机分布的假设。

F_{ST} 作为分化系数分析日本鳗鲡种内遗传结构的结果为 0.0098 ($P = 0.00048$; 10000 iteration),这一结果说明日本鳗鲡种内存在着虽然较弱但却显著的分化。如果将欧洲鳗鲡也考虑在内各分类单元间的分化系数(F_{ST})为 0.0167 ($P = 0.00070$; 10000 iteration)——略高于日本鳗鲡的种内分化,这与预期的结果相一致。进一步比较各分类单元间 F_{ST} 及 R_{ST} 逐一对应矩阵(表 3)再次证实了 JAP-HAN 与 JAP-MIN, JAP-HAN 与 JAP-KAG 亚种之间无显著遗传分化($P > 0.05$),而从表 3 中还可以看出种群与欧洲鳗鲡种群之间的遗传分化是最大的。JAP-KAG 与 JAP-CHA, JAP-KAG 与 JAP-MIN 之间也产生了显著的遗传分化($P < 0.01$)。

表 2 日本鳗鲡和欧洲鳗鲡 5 个分类单元 7 对微卫星引物的等位基因数目(A)、多态位点的平均等位基因数(A_p)、观察杂合度(H_o)、预期杂合度(H_e)

Tab.2 Number of alleles (A), mean number of the polymorphic alleles (A_p), observed heterozygosity (H_o), expected heterozygosity (H_e) at 7 microsatellite loci for five studied OTUs of *A. anguilla* and *A. japonica*

位点	项目	ANG-LOI	JAP-KAG	JAP-CHA	JAP-MIN	JAP-HAN	A_p
Ang101	A	12	17	12	12	16	13.8
	H_o	0.05	0.125	0.075	0.000	0.000	0.050
	H_e	0.895	0.939	0.913	0.910	0.929	0.925
Ang114	A	23	15	20	12	13	16.6
	H_o	0.55	0.300	0.375	0.025	0.075	0.265
	H_e	0.935	0.951	0.922	0.924	0.888	0.924
Ang151	A	11	14	12	8	14	11.8
	H_o	0.075	0.150	0.225	0.125	0.175	0.150
	H_e	0.896	0.859	0.811	0.784	0.908	0.852
Aro054	A	15	15	15	16	14	15.0
	H_o	0.025	0.175	0.075	0.000	0.075	0.070
	H_e	0.922	0.916	0.909	0.938	0.934	0.924
Aro063	A	17	22	26	25	14	20.8
	H_o	0.45	0.400	0.575	0.275	0.100	0.360
	H_e	0.874	0.955	0.958	0.952	0.937	0.935
Aro095	A	11	16	20	16	12	15.0
	H_o	0.175	0.425	0.350	0.300	0.175	0.285
	H_e	0.882	0.929	0.954	0.924	0.897	0.917
Aro121	A	13	16	17	13	15	14.8
	H_o	0.150	0.325	0.175	0.025	0.100	0.155
	H_e	0.919	0.912	0.945	0.914	0.919	0.922

注:所有样本数 $n = 40$; ANG-LOI 单元在 Ang114 位点的 P 值为 0.00165,其余 P 值均为 0

表 3 各分类单元间 F_{ST} 及 R_{ST} 逐一对应矩阵

Tab.3 Pairwise matrix of F_{ST} and R_{ST} among all OTUs

分类单元	ANG-LOI	JAP-KAG	JAP-CHA	JAP-MIN	JAP-HAN
ANG-LOI	—	0.3544	0.3588	0.2476	0.2430
JAP-KAG	0.0192 * *	—	0.1073	0.0646	0.1683
JAP-CHA	0.0351 * *	0.0085 * *	—	0.1908	0.3256
JAP-MIN	0.0253 * *	0.0064 * *	0.0081 *	—	0.0425
JAP-HAN	0.0280 * *	0.0122	0.0173 *	0.0060	—

注: F_{ST} 为等位基因数目差异(对角线以上), R_{ST} 为等位基因频率差异(对角线以下)。运用 Fisher 法来估算统计显著度, * 表示 $P < 0.05$, ** 表示 $P < 0.01$

两类分化系数(F_{ST} 和 R_{ST})从等位基因数目差异及等位基因频率差异两方面揭示了一个较明显的遗传结构,作者采用了 Goldstein 等(1995)定义的遗传距离来揭示各分类单元间的遗传关系(表 4、图 1)。从系统发生树中可以发现两簇分支分别代表了欧洲鳗鲡和日本鳗鲡两个远缘种。显然,欧洲鳗鲡与日本鳗鲡在早期进化历程中具有非常近的亲缘关系,只是在经历了较长时期的海洋环境变化后才分化为两个不同的种。

表 4 日本鳗鲡 4 个亚种群的遗传距离矩阵和栖息地空间距离矩阵

Tab.4 Genetic distance matrix to geographic distance matrix of 4 *A. japonica* subpopulations

分类单元	JAP-CHA	JAP-HAN	JAP-KAG	JAP-MIN
JAP-CHA	—	1014.8	774.0	612.1
JAP-HAN	22.193	—	1602.4	427.5
JAP-KAG	6.82938	6.63937	—	1176.8
JAP-MIN	12.2964	1.88138	3.00799	—

注:对角线以下为 5 个分类单元间的遗传距离 $D1$, 对角线以上为 5 个分类单元间的栖息地空间距离(km)

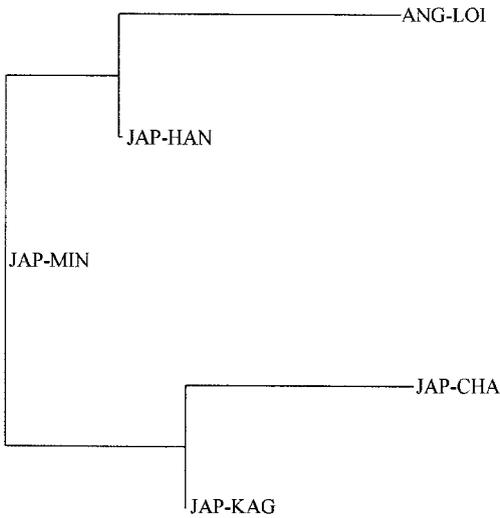


图 1 采用 Goldstein 遗传距离构建的欧洲鳗鲡和日本鳗鲡各分类单元间的系统发生树

Fig.1 Neighbor-joining phenogram depicting genetic distance relationships of *A. anguilla* and *A. japonica* based on Goldstein's distance among five OTUs

从以上的研究中不难发现,随机交配假设在日本鳗鲡种群中无法成立,因此鳗鲡个体也不是在种群内随机分布的。但是在其种内存在着一定程度的分化和变异,那么究竟是什么因素引起了鳗鲡种内产生分化的呢?为探究日本鳗鲡种内分化程度与其栖息地空间隔离程度间的相关性,作者对两者进行了 Mantel 检验,遗传距离采用 Goldstein 等(1995)定义的 $D1$ 构建了各 OTUs 的遗传距离矩阵和 5 个分类单元间的栖息地空间距离矩阵(表 4)。其中的空间距离是通过假设地球表面是光滑的平面,然后根据日本鳗鲡 4 个亚种群栖息地的经纬度计算得来。结果是遗传距离矩阵与空间距离矩阵的 Pearson 相关系数 r 值仅为 0.2498 (1000 permutations)。由此可以看出栖息地的地理隔离在遗传结构的形成上的确起到了一定的作用,但很难说其是主要因素。由于鳗鲡在由深海至河口的被动洄游过程中受到多种自然因素(如:洋流等)的共同影响,因此栖息地的差异不可能成为塑造其遗传结构的主导因素。作者认为,鳗鲡产卵地的不同可能才是造成种内遗传分化的真正原因。

在探究了日本鳗鲡种内分化原因的基础上,作者又深入地思考了鳗鲡进化过程中的一重要事件——种的分化,即日本鳗鲡与欧洲鳗鲡的分化过程。上面的研究中已经暗示

了日本鳗鲡与欧洲鳗鲡在地质历史时期存在一定的亲缘关系,接下来就要回答它们是什么时候分化的、如何分化的。本文中所采用的遗传距离参数 $D1$ (实际是遗传距离的均方),其理论依据是 Moran(1975)提出的,即:在严格的逐步突变模型下,固定大小的种群在无世代重叠的条件下,等位基因产生变异,这种变异的累积造成了物种之间的分化,并由此产生了遗传距离。Goldstein 等(1995)给出了以下公式来说明 $D1$ 的数学期望 $E[D1(\tau)]$ 与世代数之 τ 间具有线性关系。

$$E[D1(\tau)] = 2(2N - 1)\mu + \tau 2\mu$$

这里的 $D1$ 是指源自同一种群中相同祖先基因(微卫星位点具有相同的重复子个数)经 τ 世代,分化为不同(重复子个数不同)的等位基因过程中重复子个数的均方。作者在计算中设定其突变率为 0.000 560 (Minch, 1997¹⁾),据此推算出两种远缘鳗鲡的分化世代数为 224 320,按照每一世代 10 年左右计算约为 200 多万年。200 多万年这一时间表明可以将鳗鲡种的分化与北半球海洋中的一个重大事件——跨越北极的互变(the trans-Arctic interchange) (Cunningham *et al.*, 1998)联系起来。地质资料表明,在新生代的大部分时期,在北美洲和亚洲间的区域(即现在的白令海峡)曾是一段陆桥,并由此阻断了海洋生物自太平洋向大西洋的迁移,但这种隔离因为近 350 万年前白令海峡的开口而终止,这就为以后海洋生物从太平洋向大西洋的不对称迁移 (Vermeij, 1991) 提供了可能。据此,作者推断鳗鲡的分化及分布过程也许同样服从跨越北极的模式,这就与 Aoyama 等(1997) 先前关于鳗鲡全球进化、分布的理论相悖了。Aoyama 等(1997)认为鳗鲡最早起源于西太平洋位于今天印度尼西亚附近海域的大洋中,接下来其中的一支向西穿越古地中海(Tethys Sea),进而分化为北大西洋的欧洲鳗鲡和美洲鳗鲡。由于缺乏关于鳗鲡跨越北极互换的化石资料,无法确切描绘这样一个过程,但作者相信这一假设至少丰富了人们对鳗鲡起源、进化的认识,同时也将吸引更多的人来关注这一演化过程。

3 结论

作者试图进一步考察日本鳗鲡的遗传结构,并在此基础上探究日本鳗鲡与欧洲鳗鲡的进化关系。从中得出以下三个结论:首先, Schimidt 的随机交配假设在西太平洋日本鳗鲡种群中必须重新审视。其次,鳗鲡栖息地的差异也许对塑造鳗鲡的遗传结构起到一定的作用,但其根本原因可能还是产卵地的差异。最后,微卫星遗传标记在重建物种的系统发生关系方面具有良好的应用前景,特别是采用 Goldstein 的遗传距离参数可以用于计算物种的分化时间,如果能很好地与地理事件结合在一起,就可以推断其进化过程。

致谢 丹麦斯亚国际贸易公司上海欧鳗公司仇禄曾研究员提供近 100 尾欧鳗样品,广东省汕头市海洋与渔业局陈旭明科长、申勋湛先生协助提供 40 余尾韩江河口日本鳗鲡样品,福建省连江县海山水珍品开发公司翁庆华经理协助提供 40 余尾闽江河口日本鳗鲡样品及 40 余尾日本九州岛日本鳗鲡样品,谨致谢忱。

1) Mich E, 1997 MICROSAT, Version 1.5b.
Stanford University Medical Center Stanford

参 考 文 献

- 徐 斌,李德尚,张培军,1997 鱼类生长激素的分子生物学和应用研究的进展 海洋与湖沼,28(5): 553—557
- 徐 鹏,周岭华,相建海,2001 中国对虾微卫星 DNA 的筛选 海洋与湖沼,32(3): 255—259
- Aoyama J, Katsumi T, 1997. Evolution of the freshwater eels. *Naturwissenschaften*, 84: 17—21
- Avise J C, Helefan C S, Saunders N C *et al*, 1986. Mitochondrial DNA differentiation in North Atlantic eels: population genetic consequences of an unusual life history pattern. *Proc Nat Acad Sci USA*, 83: 4350—4354
- Chan I K K, Chan D K O, Lee S C *et al*, 1997. Genetic variability of the Japanese eel *Anguilla japonica* (Temminck & Schlegel) related to latitude. *Ecol Freshwat Fish*, 6: 45—49
- Comparini A, Rodino E, 1980. Electrophoretic evidence for two species of *Anguilla leptocephali* in Sargasso Sea. *Nature*, 287: 435—437
- Cunningham C W, Collins T, 1998. Beyond area relationships: Extinction and recolonization in marine molecular biogeography. In: DeSalle R, Schierwater B ed. *Molecular Approaches to Ecology and Evolution*. Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland, 297—322
- DeLigny W, Pantelouris E M, 1973. Origin of the European eel. *Nature*, 246: 518—519
- Ege V, 1939. A revision of the genus *Anguilla* Shaw: a systematic, phylogenetic and geographical study. *Dana Rep*, 16: 1—256
- Feldman M W, Bergman A, Pollock D D *et al*, 1997. Microsatellite genetic distances with range constraints: analytic description and problems of estimation. *Genetics*, 145: 207—216
- Goldstein D B, Linares A R, Cavalli-Sforza L L *et al*, 1995. An evaluation of genetic distances for use with microsatellite loci. *Genetics*, 139: 463—471
- Goudet J, 1995. FSTAT (Version 1.2), A computer program to calculate *F* statistics. *J Heredity*, 86: 485—486
- Guo S W, Thompson E A, 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions for multiple alleles. *Biometrics*, 48: 361—372
- Lantas C, Hirano J, Archer A, 1998. Genetic variation in the European eel (*Anguilla anguilla*) *Mol Mar Bio Biotech*, 7: 263—269
- Mantel N, 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res*, 27: 209—220
- Moran P A P, 1975. Wandering distributions and the electrophoretic profile. *Theor Pop Biol*, 8: 318—330
- Nauta M J, Weissing F J, 1996. Constraints on allele size at microsatellite loci: implications for genetic differentiation. *Genetics*, 143: 1021—1032
- Page R D M, 1996. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences*, 12: 357—358
- Raymond M, Rousset F, 1995. GENEPOP (Version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J Heredity*, 86: 248—249
- Rice W R, 1989. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, 43: 223—225
- Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T, 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, 29—71
- Schmidt J, 1925. The breeding places of the eel. *Smithonian Inst Ann Rep*, 1924: 279—316
- Slatkin M, 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*, 139: 457—462
- Tautz D, 1993. Notes on the definition and nomenclature of tandemly repetitive DNA sequences. In: Pena S D J, Chakraborty R, Epplen J T *et al* ed. *DNA Fingerprinting: State of the Science*. Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland, 21—28
- Tesch F W, 1977. *The Eel: Biology and Management of Anguillid Eels*. London: Chapman and Hall, 1—434
- Tsukamoto K, 1992. Discovery of the spawning area for Japanese eel. *Nature*, 356: 789—791
- Vermeij G J, 1991. Anatomy of an invasion: The trans-Arctic interchange. *Paleobiology*, 17: 281—307
- Weir B S, Cockerham C C, 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38: 1358—1370
- Wirth T, Bernatchez L, 2001. Genetic evidence against panmixia in the European eel. *Nature*, 409: 1037—1040

MICROSATELLITE VARIATION OF JAPANESE EEL (*ANGUILLA JAPONICA*) AND EUROPEAN EEL (*A. ANGUILLA*)

LIANG Jun, LI Dao-Ji, LU Li-Qiong[†]

(State Key Laboratory of Estuarine and Coastal Research, East China Normal University, Shanghai, 200062)

[†] (Department of Environmental Science and Technology, East China Normal University, Shanghai, 200062)

Abstract The migratory behavior in life cycles of eel is still a mystery. In this article we applied microsatellite markers to investigate the genetic structure of *Anguilla japonica* and verify the panmixia hypothesis of eel in western Pacific Ocean. Furthermore we also tried to explore the evolutionary history of freshwater eels (*A. japonica* and *A. anguilla*). Allelic variation at a total of 7 microsatellites was examined among elvers of freshwater eels. The number of alleles at these loci ranged from 8 to 26. Thirty-five performed tests revealed significant deficits of heterozygotes ($P < 0.01$). Significant departure from expectations of Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) was found for all loci within four subpopulations of *A. japonica*, which rejected the panmixia hypothesis (Schmidt, 1925). Also exact tests of population differentiation based on allelic frequency distribution refuted the hypothesis of random distribution of individuals among populations. Population structure in four subpopulations of *A. japonica* was recognized by a weak but significant global genetic differentiation (F_{ST}) value of 0.0098 ($P = 0.00048$; 10000 iteration). Pairwise matrixes of F_{ST} and R_{ST} showed the significant difference between two distant related species——*A. japonica* and *A. anguilla*. Results from Mantel test show that Pearson's correlation (r) of two matrixes (genetic distance matrix of 4 *A. japonica* subpopulations to geographic distance matrix) is 0.2498 (1000 permutations). Obviously the geographic isolation of habitat may play an important role in shaping the genetic structure but the intrinsic reason may due to the hatchery variations. The divergent time of these two species calculated by Goldstein distance method is over 2 million years. The results may challenge the former theory about the distribution of freshwater eels. We can infer that eel may involve in the trans-Arctic exchange in its evolutionary history. Actually further evidences are required to prove our assumption about the distribution of freshwater eels.

Key words Microsatellites, Genetic structure, Genetic distance, *Anguilla japonica*, *Anguilla anguilla*