

学校编码：10384

密级_____

学号：22420051151149

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

我国南部海域条纹斑竹鲨形态差异与
遗传多样性研究

Studies on Morphological Variations and Population
Genetic Diversity of *Chiloscyllium plagiosum* along
Southern China Coast

李 萌

指导教师姓名：王军教授

专 业 名 称：海洋生物学

论文提交日期：2012 年 月

论文答辩时间：2010 年 月

2012年6月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。
2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月

目 录

摘要	I
Abstract	III
缩略语中英文对照表	V
第一章 引言	1
1.1 遗传多样性	1
1.1.1 遗传多样性的概念及其研究意义	1
1.1.2 遗传多样性的研究方法	2
1.2 条纹斑竹鲨简介	13
1.2.1 条纹斑竹鲨的生殖生物学研究	15
1.2.2 条纹斑竹鲨机体组织成分的研究	16
1.2.3 条纹斑竹鲨的形态结构及行为学研究	16
1.2.4 条纹斑竹鲨遗传多样性研究	17
1.3.本研究目的和意义	17
第二章 中国南部海域条纹斑竹鲨群体形态比较	19
2.1 材料与方法	19
2.1.1 材料	19
2.2.2 实验方法	19
2.2 结果与分析	21
2.2.1 方差分析	21
2.2.2 主成分分析	24
2.2.3 聚类分析	27
2.2.4 判别分析	28

2.3 讨论	29
第三章 中国南部海域条纹斑竹鲨群体遗传多样性研究	32
3.1 材料与方法	32
3.1.1 实验材料	32
3.1.2 药品及器材	32
3.1.3 实验方法	33
3.2 实验结果与分析	36
3.2.1 基因组 DNA 提取及 ND2 基因扩增效果	36
3.2.2 条纹斑竹鲨 ND2 基因序列变异分析	37
3.2.3 条纹斑竹鲨群体内遗传变异分析	44
3.2.4 条纹斑竹鲨群体间遗传变异分析	47
3.3 讨论	51
3.3.1 条纹斑竹鲨群遗传多样性水平分析	51
3.3.2 条纹斑竹鲨群体内遗传多样性水平分析	52
3.3.3 条纹斑竹鲨群体间遗传多样性分析	54
第四章 小结	57
4.1 形态学分析结论	57
4.2 分子遗传学结论	57
4.3 创新点	58
4.4 展望	58
参考文献	59
致谢	65

Content

Abstract in Chinese	I
Abstract in English	III
List of abbreviations	V
Chapter 1 Introduction	1
1.1 Genetic diversity	1
1.1.1 Definition and significance of genetic diversity	1
1.1.2 Research methods of Genetic diversity	2
1.2 Introduction of <i>Chiloscyllium plagiosum</i>	13
1.2.1 Reproductive biology research of <i>Chiloscyllium plagiosum</i>	15
1.2.2 Research about the Organization constituents of <i>Chiloscyllium plagiosum</i>	16
1.2.3 Morphology and Ethology research of <i>Chiloscyllium plagiosum</i>	16
1.2.4 Genetic diversity research of <i>Chiloscyllium plagiosum</i>	17
1.3 Purpose and significance of the research	17
Chapter 2 Morphological Variations of <i>Chiloscyllium plagiosum</i> in Different Geographical Populations along Southern China Coast	19
2.1 Materials and methods	19
2.1.1 Materials	19
2.2.2 Methods	19
2.2 Results and analysis	21
2.2.1 One-way ANOVA	21
2.2.2 Principal component analysis	24

2.2.3 Clustal analysis	27
2.2.4 Discriminatory analysis	28
2.3 Discussion	29
Chapter 3 Research of population genetic structure of <i>Chiloscyllium</i>	
<i>plagiosum</i> along southern China coast	32
3.1 Materials and methods	32
3.1.1 Materials	32
3.1.2 Reagent and apparatus	32
3.1.3 Methods	33
3.2 Results and analysis	36
3.2.1 Extraction of genomic DNA and amplification of ND2 gene	36
3.2.2 Analysis of ND2 Sequences	37
3.2.3 Analysis of genetic diversity within population of <i>Chiloscyllium</i>	
<i>plagiosum</i>	44
3.2.4 Analysis of genetic diversity among populations of <i>Chiloscyllium</i>	
<i>plagiosum</i>	47
3.3 Discussion	51
3.3.1 Analysis of genetic diversity of <i>Chiloscyllium plagiosum</i>	51
3.3.2 Analysis of genetic diversity within population of <i>Chiloscyllium</i>	
<i>plagiosum</i>	52
3.3.3 Analysis of genetic diversity among populations of <i>Chiloscyllium</i>	
<i>plagiosum</i>	54
Chapter 4 Conclusion	57
References.....	59
Acknowledgements	65

摘要

本论文从形态和分子水平探讨了我国南部海域条纹斑竹鲨 5 个地理群体（广东雷州群体、海南琼海群体、广西北海群体、福建平潭群体和台湾屏东群体）的形态差异、种内和种间遗传结构，为我国南部沿海条纹斑竹鲨种质资源的保护及合理利用提供了理论依据，主要结果如下：

运用 4 种多元分析方法对海南琼海，广东雷州，广西北海，福建平潭以及台湾屏东等 5 个群体条纹斑竹鲨的 19 项形态性状进行了群体间差异分析和判别分析。分析结果显示：条纹斑竹鲨 5 个群体间有 16 项特征变量差异极显著 ($P < 0.01$)；主成分分析得到的 5 个主成分对不同群体间总变异方差的贡献率分别为 28.023%、12.676%、9.669%、9.100%、7.703%，累计贡献率为 67.171%；主成分分析和聚类分析结果均显示，福建平潭群体和台湾屏东群体形态最为相似，此外，广东雷州、海南琼海和广西北海 3 个群体间形态也较相似，但和福建平潭、台湾屏东两群体差异较大。以逐步判别法建立了条纹斑竹鲨 5 个群体的判别函数，判别准确率分别为：80.0%-100% (P1)，85.3%-100% (P2)，综合判别准确率达到 93.4%。

采用分子遗传学方法，对 5 个群体条纹斑竹鲨 ND2 序列进行了遗传多样性分析，获得了条纹斑竹鲨线粒体 DNA 的 ND2 基因全序列及两侧 tRNA 部分序列共 1260bp，具 15 个单倍型，21 个多态性位点，单倍型多样性指数 $h = 0.459$ ，遗传多样性指数 $\pi = 0.00074$ 。核苷酸组成呈明显的反 G 偏倚，密码子使用也存在明显偏倚。对各群体 ND2 基因的中性检验、单倍型网络关系图及核苷酸不配对曲线图综合分析，推测条纹斑竹鲨群体经历过群体扩张，推测发生在距今 37,026 年前。综合分析单倍型系统进化树和单倍型网络关系图，推测雷州群体和北海群体为较原始群体；而台湾群体的单倍型分布已经与南海北部群体（雷州群体、琼海群体、北海群体）产生分化；各群体间遗传分化指数表明，台湾群体与其他 4 个群体存在基因交流障碍，其余群体的遗传分化模式基本符合距离

隔离遗传模式，遗传分化受到地理结构和距离隔离的影响。

关键词：条纹斑竹鲨；形态差异；ND2 基因；遗传多样性

厦门大学博硕士论文摘要库

Abstract

Population genetic structure of 5 populations of *Chiloscyllium plagiosum* (Beihai, Leizhou, Qionghai, Pingtan, Taiwan) along Southern China coast was investigated by morphological analysis and molecular analysis of ND2 sequences in mitochondrial DNA. These results will provide the theory basis for protecting and developing the resources of *Chiloscyllium plagiosum* along southern China coast. The main results are shown as follows:

Four multivariation analysis were used to investigated the morphological variations among 5 stocks of bamboo shark *Chiloscyllium plagiosum* collected from Qionghai in Hainan province, Leizhou in Guangdong province, Beihai in Guangxi province, Pingtan in Fujian province and Pingdong in Taiwan. ANOVA indicated that 16 morphometric proportional parameters showed significant morphological variations ($P < 0.01$) among the 5 stocks. Through principal component analysis, five principal components were established, with their contributory ratio being 28.023%, 12.676%, 9.669%, 9.100%, 7.703%, and the cumulative contributory ratio being 67.171%. The results of clusters analysis and principal component analysis revealed that Pingtan stock and Taiwan stock had similar morphological characters, the same as Leizhou stock, Qionghai and Beihai stocks. Discriminant function of 5 populations were established, discrimination accuracy ratio being 80.0%-100% for P1 and 85.3%-100% for P2, the integrative discrimination accuracy ratio being 93.4%.

The length of ND2 sequences in the tested sharks is 1260 bp, including the partial sequences of tRNA sequences on both sides of ND2 sequences. 21 variable sites are identified, with 15 haplotypes. The average nucleotide diversity of 5 populations is 0.00074, and the average haplotype diversity is 0.459. The nucleotide composition

shows a nucleotide bias against G. The results of neutral test, haplotype network and mismatch distribution analysis show that expansion might have happened in the evolution of *Chiloscyllium plagiosum*, and the estimated split time was 3.7MY. Haplotype network shows there are two possible ancestor populations of *Chiloscyllium plagiosum*. The genetic differentiation among 5 populations shows almost agreement with distance-isolation model. Taiwan population may be divergence from other populations by lacking of gene flow with others.

Key words: *Chiloscyllium plagiosum*; morphological variation; ND2; Genetic diversity.

缩略语中英文对照表

AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism	扩增片段长度多态性
AMOVA	Analysis of Molecular Variance	分子方差分析
ANOVA	Analysis of Variance	方差分析
ATP	Adenosine-Triphosphate	三磷酸腺苷
bp	Base pair	碱基对
COI	Cytochrome oxidase I	细胞色素 <i>c</i> 氧化酶亚基 I
Cyt <i>b</i>	Cytochrome <i>b</i>	细胞色素 <i>b</i>
Df	Degree of Freedom	自由度
DNA	Deoxyribonucleic Acid	脱氧核糖核酸
EB	Ethidium bromide	溴化乙啶
EDTA	Ethylene Diamine Teraacetic Acid	乙二胺四乙酸
FISH	Flourecence in <i>situ</i> hybridization	荧光原位杂交
Fst	Genetic Differentiation Index	遗传分化指数
ITS	Internal Transcribed Spacer	转录间隔区
MEGA	Molecular Evolutionary Genetics Analysis	分子进化分析软件包
min	minutes	分钟
ML	Maximum Likelihood method	最大似然法
MP	Maximum Parsimony method	最大简约法
mtDNA	Mitochondrial DNA	线粒体 DNA
MY	Million Year	百万年
NJ	Neighbor-Joining method	邻接法
ND2	NADH dehydrogenase subunit 2, NADH	脱氢酶第二亚基
PCR	Polymerase Chain Reaction	聚合酶链式反应
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA	随机扩增多态性 DNA

缩略语中英文对照表

RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism	限制性片段长度多态性
RNA	Ribonucleic Acid	核糖核酸
rRNA	Ribosomal Ribonucleic Acid	核糖体 RNA
s	second	秒
SDS	Sodium dodecyl sulfate	十二烷基硫酸钠
SSCP	Single-Strand Conformation Polymorphism	单链构象多态性
SSD	Sum of Squared Defferences	方差总和
SSR	Simple Sequence Repeats	简单串联重复序列
TAE	Tris-acetic acid-EDTA buffer	Tris-乙酸 EDTA 缓冲液
TBE	Tris-boric acid-EDTA buffer	Tris-硼酸 EDTA 缓冲液
TE	Tris-EDTA buffer	Tris-EDTA 缓冲液
Tm	Melting Temperature	DNA 变性温度
U	Unit	活性单位

第一章 引言

1.1 遗传多样性

1.1.1 遗传多样性的概念及其研究意义

生物多样性 (Biodiversity) 是一个描述自然界多样性程度的概念, 最早由 Walter G. Rosen 于 1985 年提出^[1]。由于其内涵十分丰富, 许多学者根据自己的理解对这个概念下过不同的定义。目前被广泛接受的是蒋志刚等^[2]在《保护生物学》中所做的定义: “生物多样性是生物及其环境形成的生态复合体以及与此相关的各种生态过程的综合, 包括动物、植物、微生物和它们所拥有的基因以及它们与其生存环境形成的复杂的生态系统。” 而生物多样性又被分成遗传多样性 (genetic diversity)、物种多样性 (species diversity)、生态系统多样性 (ecosystem diversity) 和景观多样性 (landscape diversity) 4 个基本水平^[3]。

遗传多样性也被称为种内多样性 (within-species diversity) 或种下多样性 (intro-specific diversity), 一个物种的遗传多样性通常可以从以下三个方面加以阐述: 一、个体内的遗传多样性; 二、种群内不同个体之间的遗传多样性; 三、不同群体之间的遗传多样性^[1]。因此, 遗传多样性的概念可以概括为表示不同群体间或同一群体内不同个体间遗传变异的总和^[4]。由于所有的变异最终都来源于遗传基因的多样化, 因而遗传多样性对其他多样性水平具有决定性意义。

虽然所有的遗传多样性都发生在分子水平, 但遗传多样性不止表现在分子水平上, 还同时表现在生命的各个层次上, 如细胞、组织与器官、物种个体形状、物种行为等方面。全球的遗传多样性库代表了地球上各种生物结构、功能和过程的相关信息, 即是说, 生物每个过程和每种模式, 都在容量巨大的全球遗传“基因库 (Gene pool)” 中被编码^[1]。

遗传多样性作为生物多样性其他层次的基础和决定性因素，对其进行研究就具有特别重要的理论和实际意义。首先，遗传多样性的研究可以用来描述种群遗传变异和维持变异的机制。遗传多样性是种群或群体长期进化和适应的结果，遗传多样性越高，其对周围生存环境的适应能力就越高，即具有越强的生存和进化潜力，所以对遗传多样性的研究可以用来分析种群的生存力。其次，遗传多样性在种群生活史研究中也起到重要作用，通过对种群生活史中每个环节的遗传多样性变化进行深入的研究探讨，以此揭示种群数量变化的内在机制，这一作用在群体生态学及保护生物学研究中都具有重要意义^[4]。再次，研究生物遗传多样性在濒危动植物保护工作中也发挥了核心作用。通过对濒危物种遗传变异的大小及其与周围环境关系的研究可以从分子水平揭示动植物濒危的机理，从而做好科学合理的利用和保护生物资源的措施。最后，对遗传多样性的研究显然也有助于人类更清楚的认识生物多样性的起源与进化，对生物的系统进化研究提供有益资料，并为生物遗传育种工作奠定基础^[3]。总之，遗传多样性决定了物种的生态和进化潜能，为生物进化、地理分化和生物保护的研究提供了研究方法，奠定了研究基础。

1.1.2 遗传多样性的研究方法

遗传多样性的研究始于上个世纪，早期的达尔文、孟德尔等生物学家碍于技术限制，只能对生物表型性状的遗传变异进行研究。后来遗传多样性的检测手段随着生物研究层次的提高以及实验技术的发展而日趋丰富和成熟，到 20 世纪末，美国科学家 Botstein 提出了 DNA 限制性酶切片长度多态性（RFLP）可以作为遗传标记，遗传多态性的检测手段才进入分子水平^[5]。它的发展过程经历了形态学水平、染色体水平、生理生化水平和分子水平四个阶段，四种水平分别从四种角度对生物遗传多样性进行分析，每种方法都具有其优点和相对的局限性，因此能为遗传多样性研究提供多方面资料。

1.1.2.1 形态学水平

形态特征指生物特定的肉眼可见的外部特征特性，一般指两类性状，一类是符合孟德尔遗传规律的单基因性状，包括质量性状、稀有突变等；一类则是由多基因决定的数量性状^[6]。形态学研究能够直观的以表型性状来研究遗传变异，因而具有简便、快速的优点，是研究遗传变异的最传统、最简便的方法，结合科学正确的数量遗传学方法，可以在较短时间内对所研究物种的遗传变异水平有一个基本了解。直到今日，对物种的分类或种质资源鉴定等工作仍旧是以形态特征鉴别为主要或初步工作。但是由于形态特征受基因型和环境因素的共同作用，因而形态特征有时不能完全真实地反映基因变异情况，仍然需要与其他研究结果综合比较分析才能得到比较真实的研究结果。

1.1.2.2 染色体水平

染色体作为遗传物质的载体，其变异必然导致遗传变异的发生。细胞遗传学研究发现，染色体结构的变化（如缺失、重复、倒位、易位等）和数目的变化（如单倍体、三倍体等），常常引起表型性状的变异。染色体变异的研究主要从三个方面进行：染色体组型特征、染色体核型特征和染色体带型特征。染色体组型特征即包括染色体的数目变化（如单倍体、三倍体等非整倍体）和结构变化（如缺失、重复、倒位、易位等），以上变化都有其各自特定的细胞学特征，因而可以作为一种细胞标记。染色体核型研究是建立在显微摄影技术的基础之上的，它的原理是把生物的某一个体或某一分类群的体细胞内整套染色体显微摄影后放大，将所有染色体按相对臂长、臂指数、着丝粒指数和染色体臂数等 4 项参数重新排列，以作为一种细胞学特征。染色体分带技术是将某物种染色体制片用不同物化手段处理，再用不同染料染色，在荧光激发下染色体臂会显示出不同的带数，如 G 带（Giemsa banding），C 带（Constitutive heterochromatin banding），N 带（Nucleolar organizer region banding）等，可明确鉴别许多物种核型中的任一条染色体^[5]。

这种方法虽然克服了形态学特征容易受环境影响的缺憾^[7]，但染色体变异的检测方法受物种和染色体特征影响，因而染色体标记的数目有限，另一方面，

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士学位论文摘要库