

中国南部沿海条纹斑竹鲨遗传多样性研究

陈 骁, 杨圣云*, 潘 聪

(厦门大学海洋与环境学院, 福建 厦门 361005)

摘要: 采用随机引物扩增多态性 DNA (RAPD) 技术分析了我国南部沿海闽东 (MD)、闽南 (MN)、粤西 (YX) 3 个条纹斑竹鲨地理群体遗传多样性和遗传结构。结果表明, 34 个随机引物在这 3 个群体中共检测出 316 个位点, 各群体检测出的位点数分别为 308、308、303, 其中多态位点数分别为 49、52、42, 多态位点比例分别为 15.90%、16.88%、13.86%。3 个群体的 Shannon 多样性指数分别为 0.099 8、0.105 5、0.093 6; 表明条纹斑竹鲨群体的遗传多样性水平较低。遗传距离和 UPGMA 聚类分析结果显示条纹斑竹鲨的基因交流模式属于沿海岸线的距离隔离模式, 遗传差异大小与地理距离远近相关。进行分子方差分析 (AMOVA) 得到遗传变异固定指数 ($F_{ST} = 0.044\ 04$, $p < 0.05$), 显示大部分变异 (95.60%) 发生在群体内部, 群体间变异较小 (4.40%)。

关键词: 条纹斑竹鲨; 遗传多样性; 分子方差分析; 随机引物扩增多态性 DNA

中图分类号: Q 958.1

文献标识码: A

文章编号: 0438-0479(2008)04-0580-05

鲨鱼是海洋食物链中的顶级捕食者, 其存在能影响其他许多海洋动物的生存和种群数量。如果鲨鱼遭到过度捕捞, 将严重影响海洋生态系统中生物群落的组成和生态环境^[1]。鲨鱼生殖力低下、生殖周期长、生长缓慢, 资源遭到过度捕捞后较难恢复^[1-3]。目前随着鲨鱼捕捞作业海区不断扩大, 渔获量急剧增加, 已经对全球鲨鱼种群的维持造成严重影响, 联合国粮农组织已经开展鲨鱼保护的计划^[4-5]。条纹斑竹鲨 (*Chiloscyllium plagiosum* Bennett, 1830) 属于须鲨科, 斑竹鲨属, 是体内受精、卵生的暖水性小型鲨鱼, 主要栖息于近岸海床摄取底栖动物为食, 游泳能力较弱, 在我国从东海到台湾海峡及南海都有分布^[1]。近年来随着捕捞压力的增大, 其种群数量已经大为减少。条纹斑竹鲨个体间的形态特征差异较小, 难以用形态测量的方法对种群进行研究。标志放流曾经是研究鲨鱼种群活动的主要方法, 但是该方法效率较低并且会造成鱼体损伤, 不适用在小型鲨鱼种类的研究上^[6]。因此国内目前还没有开展对条纹斑竹鲨种群生态学的研究。

随着分子生物学技术的发展, 分子标记技术在种群生态学研究得到了广泛的应用。在鲨鱼种群活动的研究中, 分子标记方法与标志放流方法得到的结果相吻合, 证明了该方法的实际应用价值^[7]。其中 RAPD (Random amplified polymorphic DNA) 技术由于信息量大, 检测的变异程度丰富, 成为评估群体遗传多样性

以及群体间遗传分化的常用技术之一^[8]。本文利用 RAPD 分子标记技术对我国南部沿海 3 个海域条纹斑竹鲨群体遗传多样性进行研究, 为鲨鱼资源合理开发和保护提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 样品采集与 DNA 提取

条纹斑竹鲨样品于 2006 年 4~11 月采自闽东霞浦附近海域 (MD)、闽南东山附近海域 (MN)、粤西湛江附近海域 (YX) (图 1), 取新鲜肌肉置于无水乙醇中固定, 运回实验室后保存在 -20℃ 冰箱中。从每个群体中随机抽取 8 个样品, 取 0.1 g 左右肌肉, 放入 1.5 mL eppendorf 管内剪碎后用灭菌生理盐水漂洗 3~5 次去除乙醇。然后参考 Garcia^[8] 的方法提取基因组

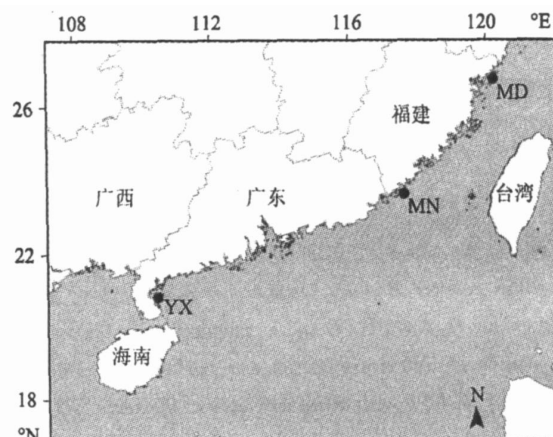


图 1 采样海域位置图

Fig. 1 Map of sampling location

收稿日期: 2008-01-22

基金项目: 中国近海海洋调查与评价专项 (908 01-ST 09)

* 通讯作者: yangsy@xmu.edu.cn

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

DNA.

1.2 随机扩增与产物检测

PCR 扩增的反应体系为: 总反应体积 25 μL, 其中 10× 反应缓冲液(含 Mg²⁺) 2.5 μL, dNTP(10 mmol/L each) 2 μL, DNA 模板(30 ng/μL) 1 μL, 随机引物(0.1 μmol/L) 1 μL, *Taq* 酶(5 u/μL) 0.2 μL, 灭菌超纯水补齐总体积. 用 Biometra T3 型 PCR 仪进行扩增, 反应程序为: 94℃ 3 min 预变性; 94℃ 1 min, 36℃ 1 min, 72℃ 2 min, 35 个循环; 最后 72℃ 延伸 5 min. PCR 产物利用 BioRAD 公司生产的 PAC-300 型电泳仪、1.4% TBE 琼脂糖凝胶电泳分离, EB 染色后用 Syngene 公司生产的 Gene Genius 凝胶成像系统拍照保存.

1.3 数据统计和分析

每个样品的扩增情况按扩增带的有或无作记录, 有扩增带的记为 1, 无扩增带的记为 0, 列出 0、1 矩阵, 用于统计分析. 每条扩增带视为一个位点, 统计扩增总位点数、多态位点数以及多态位点比例数.

1.3.1 多态位点比率 *P*

在某一特定位点上, 若扩增片段出现的频率小于 0.99, 则此位点称为多态位点. 多态位点比率 *P* = 多态位点数/ 检测到的位点总数 × 100% .

1.3.2 遗传相似系数和遗传距离

按 Nei^[9] 的方法计算群体间的遗传相似系数 *S*:

$$S = 2N_{ij} / (N_i + N_j),$$

其中 *N_{ij}* 为两群体共有的位点数, *N_i* 和 *N_j* 分别表示两群体各自的位点数. 遗传距离: *D* = 1 - *S*. 根据得到的遗传距离矩阵采用不加权配对算术平均法(UPGMA) 程序对群体进行聚类分析, 构建系统树.

1.3.3 Shannon 多样性指数

Shannon 多样性指数是生态学中用于度量物种多样性的最常用方法, Chalmers^[10] 将其改进后用于量化分析 RAPD 数据的遗传多样性. 其计算公式:

$$H = - \sum P_i \ln P_i / N,$$

其中 *H* 为多样性指数; *P_i* 为表型频率, 即第 *i* 个位点在群体中出现的频率. *N* 为检测到的总位点数. 以上数据利用 POPGENE 1.31 软件^[11] 进行计算.

1.3.4 遗传变异固定指数(*F_{ST}*)

利用 ARLEQUIN 3.11^[12] 程序进行分子方差分析(AMOVA), 计算群体间遗传变异固定指数 (*F_{ST}*)^[13], 估计群体间遗传分化情况.

2 结 果

2.1 PCR 扩增结果和遗传多样性分析

从 40 个引物(A01~ A20; B01~ B20, 上海申能博彩公司) 中筛选出 34 个扩增稳定、重复性好的引物对条纹斑竹鲨 3 个地理群体进行 RAPD 扩增, 引物 A05 的扩增结果见图 2. 单个引物检测到的位点数在 6~ 14

表 1 34 个随机引物的序列和扩增位点数量
Tab. 1 Sequences and amplified loci of 34 random primers

引物序号	引物序列	总位点数	多态位点数	引物序号	引物序列	总位点数	多态位点数
A01	CAGGCCCTTC	11	2	A20	GTTGCGATCC	8	2
A02	TGCCGAGCTG	8	2	B02	TGATCCCTGG	9	2
A03	AGTCAGCCAC	7	1	B04	GGA CTGGAGT	11	2
A04	AATCGGGCTG	13	3	B05	TGCGCCCTTC	10	2
A05	AGGGGTATTG	7	3	B06	TGCTCTGCCC	11	1
A06	GGTCCCTGAC	11	2	B07	GTCAACATGG	12	3
A07	GAAACGGGTG	7	2	B08	GTCCACACGG	8	3
A08	GTGACGTAGG	10	1	B09	TGGGGGACTC	9	3
A09	GGGTAACGCC	14	5	B10	CTGCTGGGAC	6	1
A10	GTGATCACAG	11	3	B11	GTAGACCCGT	7	2
A11	CAATCGCCGT	9	2	B12	CCTTGACGCA	9	4
A12	TCGGCGATAG	13	3	B14	TCAGGCTGTG	8	2
A13	CAGCACCCAC	12	2	B15	GGAGGGTGTT	7	1
A14	TCTGTGATGG	10	2	B16	TTTGCCCGGA	10	2
A15	TTCCGAACCC	6	2	B17	TACAGCATCG	8	2
A17	GACCGATTGT	9	3	B19	ACCCCGAAG	9	2
A18	AGGTGACCGT	8	1	B20	GGACCCTTAC	8	2

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24

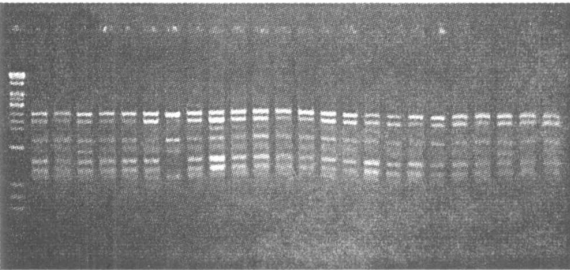


图2 引物 A05 的扩增结果
Mark. λ Eco471, 1~ 8. MD 群体, 9~ 16. MN 群体, 17~ 24. YX 群体

Fig.2 Amplified results of primer A05

之间, 多态位点数在 1~ 5 之间(表 1); 34 个引物在 3 个群体中共检测出 316 个位点, 其中多态位点 76 个, 多态位点比例为 24. 05%. 闽南群体共检测出 308 个位点, 其中多态性位点 52 个, 多态位点比例最高(16. 88%), 其次是闽东群体(15. 90%)和粤西群体(13. 86%). 闽南群体的 Shannon 多样性指数最高(0. 105 5), 其次是闽东群体(0. 099 8)和粤西群体(0. 093 6), 所有个体的总多样性指数为 0. 116 3(表 2). 多态位点比例和 Shannon 多样性指数显示条纹斑竹鲨群体的遗传多样性水平均较低.

2.2 遗传距离和聚类分析

群体间的遗传距离和遗传相似系数结果显示: 闽东和闽南群体间的遗传距离最小(0. 004 6), 闽东- 粤西、闽南- 粤西群体间的遗传距离相对较大, 分别为 0. 021 1 和 0. 017 6. UPGMA 聚类分析结果显示, 闽东群体与闽南群体先聚为一类, 然后再与粤西群体相聚(图 2). 从遗传距离和聚类分析结果可以看出群体间遗传差异的大小与相互地理距离远近相关.

2.3 分子方差分析(AMOVA)

对 3 个群体进行分子方差分析(AMOVA), 10 000 次单倍型重复随机抽样重排后进行的显著性检验都显示了分析的有效性($p < 0. 05$), 遗传变异固定指数 $F_{ST} = 0. 044 04$. 在整个遗传变异中, 各个群体之间的变异仅占 4. 40%, 大部分变异(95. 60%)发生在群体内部.

表2 条纹斑竹鲨群体扩增位点情况和 Shannon 多样性指数

Tab.2 Amplified numbers and Shannon index of *C. plagiosum* stocks

群体	总位点数	多态性位点数	多态位点比例/ %	Shannon 多样性指数
MD	308	49	15. 90	0. 0998
MN	308	52	16. 88	0. 1055
YX	303	42	13. 86	0. 0936
总体	316	76	24. 05	0. 1163

表3 条纹斑竹鲨群体间的 Nei 相似系数和遗传距离矩阵

Tab.3 Nei's similarity coefficient matrix among *C. plagiosum* stocks

	MD	MN	YX
MD		0. 9954	0. 9789
MN	0. 0046		0. 9824
YX	0. 0211	0. 0176	

注: 对角线下部为群体间遗传距离 D , 对角线上部为群体间遗传相似系数 S .

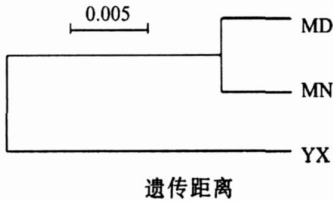


图3 条纹斑竹鲨 3 个群体间的 UPGMA 聚类图

Fig.3 UPGMA dendrogram among three *C. plagiosum* stocks

3 讨论

鲨鱼一般进行体内受精, 而且精子在雌鱼体内可以存活较长时间. 同时, 雌性鲨鱼通常返回它们出生和幼年生活的海域进行繁殖, 所以鲨鱼种群的基因交流是围绕繁殖地向外周扩散的, 长距离的直接基因交流较少见^[14]. 鲨鱼繁殖地和活动区域都在沿岸海域, 大洋和深海阻碍了许多鲨鱼的活动, 它们的基因交流主要沿着海岸线进行, 沿岸的岛屿和海峡等地理特征不但不会阻碍鲨鱼的基因交流, 而且还成为基因交流的

表4 条纹斑竹鲨群体分子方差分析(AMOVA) 结果

Tab.4 AMOVA analysis of *C. plagiosum* stocks

变异来源	自由度	变异组成	变异百分比/ %	遗传变异固定指数 F_{ST}
群体间	2	0. 62277	4. 40	
群体内	21	13. 051786	95. 60	
合计	23	14. 14062	100	0. 04404($p = 0. 0176$)

跳板和通道. 因此许多鲨鱼的基因交流模式都属于沿海岸线的距离隔离模式 (Isolation by distance model)^[15-17]. 条纹斑竹鲨主要在近岸浅海底层活动, Witga 在对其胸鳍和臀鳍形态与运动功能关系进行分析后指出条纹斑竹鲨为了适应底栖生活, 在进化过程中牺牲了游泳的灵活性来保持在底层移动的稳定, 因此活动能力很差^[18]. 这些生物学特性决定其长途迁移交配的可能性较小. 在本研究中, 条纹斑竹鲨 3 个群体间遗传距离和聚类分析结果显示 3 个群体间遗传差异大小与地理距离远近相对应, 相邻群体间的基因频率呈现连续变化, 并且从闽东到粤西沿岸没有大洋和深海等阻碍条纹斑竹鲨活动的地理结构. 因此作者认为条纹斑竹鲨的基因交流模式也属于沿海岸线的距离隔离模式.

条纹斑竹鲨的生殖方式为体内受精、卵生, 受精卵被蛋白质粘丝缠绕在礁石等固定物上^[19], 所以其基因交流由成熟个体的交配活动决定. 3 个条纹斑竹鲨群体内的多态位点比例为 13.86% ~ 16.88%, 整体多态位点比例为 24.05%. 吴冰利用 11 种随机引物对采自厦门的 4 尾条纹斑竹鲨基因组进行了 RAPD 检测, 发现 4 个个体之间的多态位点比例在 10% 以下^[20]. 由于她的样品和引物数量较少且样品为同一个地理群体, 所以多态位点比例低于本研究结果是可信的. 王奕华研究了进化地位比软骨鱼更低的青岛文昌鱼群体, 得到的 Shannon 多样性指数为 0.151 9^[21]; 张四明研究软骨硬鳞的中华鲟群体, 其 Shannon 多样性指数为 0.033 4^[22], 显示两者的群体遗传多样性水平均较低. 他们都认为种群数量减少引发的遗传漂变和近交衰退是导致物种遗传多样性较低的原因. Keeney 在利用卫星标记对西北大西洋、墨西哥湾和加勒比海长度距离 2 000 km 范围海域内的黑边鳍真鲨 *Carcharhinus limbatus* 9 个不同地理群体进行分析后, 发现其平均遗传多样性水平也较低 ($H = 0.5$). 他认为黑边鳍真鲨游泳能力强, 活动范围大, 成熟个体有返回出生地繁殖育幼的行为, 导致生活在不同海域的群体返回同一繁殖地交配, 因此群体间基因交流程度高, 遗传差异减小^[16]. 但是 Chevolut 对不列颠海域背棘鲛 *Raja clavata* 14 个地理群体进行分子方差分析显示群体间的变异度较低 (1.3%)^[23], 而标志放流重捕结果证明背棘鲛不进行长距离迁移^[24], 这说明背棘鲛群体间低水平的遗传差异不是大范围内高频率的基因交流造成的. 如前文所述, 条纹斑竹鲨活动能力差, 远距离基因交流的可能性小. 并且条纹斑竹鲨 3 个群体的分子方差分析结果显示主要变异 (95.60%) 发生在群体内部, 群体之间的变异仅占 4.40%. Martin 在对鲨鱼线粒体序列

的进化过程进行比较研究后发现鲨鱼的线粒体进化速率远低于哺乳动物和许多高等脊椎动物, 序列十分保守^[25]. 而通常认为核 DNA 的进化速率小于线粒体 DNA. 因此作者认为条纹斑竹鲨群体较低的遗传多样性水平并非遗传漂变、近交衰退或群体间频繁的基因交流造成的, 而是由于其进化保守, 核苷酸突变的速率低, 导致在相同的时间尺度下群体分化不明显. 因此与其它物种相比, 它们相对表现为基因多态性少、遗传多样性水平低、群体间遗传变异小. 研究已经证明, 软骨鱼类这一古老物种对于环境的选择压力更为敏感, 在环境急剧变化的情况下更容易灭绝^[26]. 所以必须加强对包括条纹斑竹鲨在内的软骨鱼类的保护力度, 防止种群衰退和物种灭绝.

参考文献:

- [1] 陈明茹, 丘书院, 杨圣云. 闽南近海条纹斑竹鲨的生殖生物学研究[J]. 海洋学报, 2001, 23(3): 92-98.
- [2] Au D W, Smith S E, Show C. Estimating shark rebound potential and the reproduction protection that ensures sustainability[C]// Prince E D, Pulos L M, eds. International Pelagic Shark Workshop Pacific Grove, California, USA: Blackwell, 2000: 14-17.
- [3] Copmpagno L J V. Shark exploitation and conservation [C]// Pratt H, Gruber S, Taniuchi T, eds. Elasmobranchs as Living Resources: Advances in the Biology, Ecology, Systematics and Status of the Fisheries. Seattle, USA: NMFS, 1990: 391-414.
- [4] FAO. The international plan of action for the conservation and management of sharks [M]. Rome, Italy: The FAO Committee on Fisheries (COFI), 1999.
- [5] Walker T I. Can shark resources be harvested sustainably? A question revisited with a review of shark fisheries[J]. Mar Freshwater Res, 1998, 49: 553-572.
- [6] Hueter R E. Philopatry, natal homing and localized stock depletion in shark[J]. Shark News, 1998, 12: 1-2.
- [7] Feldheim K A, Gruber S H, Ashley M V. The breeding biology of lemon sharks at a tropical nursery lagoon [J]. Proceedings of the Royal Society of London (Series B, Biological Sciences), 2002, 269: 1655-1661.
- [8] Garcia K G. Genetic diversity of cultured *Penaeus vannamei* shrimp using three molecular genetic techniques [J]. Molecular Marine Biology and Biotechnology, 1994, 3(5): 270-280.
- [9] Nei M, Li W. A mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1979, 76: 5269-5273.
- [10] Chalmers K J, Waugh R, Sprent J I, et al. Detection of genetic variation between and within population of *Glir-*

- icidia sepium* and *G. maculate* using RAPD markers[J]. Heredity, 1992, 69: 465 – 472.
- [11] Yeh F C, Yang R C, Boyle T, et al. POPGENE version 1.31: Microsoft windows - based freeware for population genetic analysis [CP]. Edmonton: Department of Renewable Resources, University of Alberta, 1999.
- [12] Excoffier L G Laval, Schneider S. Arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis[J]. Evolutionary Bioinformatics Online, 2005, 1: 47– 50.
- [13] Excoffier L, Smouse P, Quattro J. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data[J]. Genetics, 1992, 131: 479– 491.
- [14] Kohler N E, Casey J G, Turner P A. NMFS cooperative shark tagging program, 1962– 93: an atlas of shark tag and recapture data[J]. Marine Fisheries Review, 1998, 60: 1– 87.
- [15] Duncan K M, Martin A P, Bowen B W, et al. Global phylogeography of the scalloped hammerhead shark (*Sphyrna lewini*) [J]. Molecular Ecology, 2006, 15: 2239 – 2251.
- [16] Keeney D B, Heupel M R, Hueter R E, et al. Microsatellite and mitochondrial DNA analyses of the genetic structure of blacktip shark (*Carcharhinus limbatus*) nurseries in the northwestern Atlantic, Gulf of Mexico, and Caribbean sea[J]. Molecular Ecology, 2005, 14: 1911 – 1923.
- [17] Hueter R E, Heupel M R, Heist E J, et al. Evidence of philopatry in sharks and implications for the management of shark fisheries[J]. Journal of Northwest Atlantic Fishery Science, 2005, 35: 239– 247.
- [18] Wilga C D, Lauder G V. Functional morphology of the pectoral fins in bamboo sharks, *Chiloscyllium plagiosum*: benthic vs. pelagic station holding [J]. Journal of Morphology, 2001, 249: 195– 209.
- [19] 朱元鼎. 福建鱼类志(上卷) [M]. 福州: 福建科学技术出版社, 1984.
- [20] 吴冰, 陈元霖, 桂慕燕. 条纹斑竹鲨基因组的 RAPD 分析初报[J]. 遗传, 1999, 21(1): 4– 5.
- [21] 王奕华, 张士瑾, 刘振辉. 青岛文昌鱼遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 海洋水产研究, 2004, 25(3): 21– 27.
- [22] 张四明, 邓怀, 晏勇, 等. 中华鲟随机扩增多态性 DNA 及遗传多样性研究[J]. 海洋与湖沼, 2000, 31(1): 1– 7.
- [23] Chevolut M, Ellis J R, Hoarau G, et al. Population structure of the thornback ray (*Raja clavata* L.) in British waters[J]. Sea Research, 2006, 56: 305– 316.
- [24] Hunter E, Berry F, Buckley A A, et al. Seasonal migration of thornback rays and implications for closure management[J]. Journal of Applied Ecology, 2006, 43: 710– 720.
- [25] Martin A P, Naylor G J P, Palumbi S R. Rates of mitochondrial DNA evolution in sharks are slow compared with mammals[J]. Nature, 1992, 357: 153– 155.
- [26] Casey J M, Myers R A. Near extinction of a large, widely distributed fish[J]. Science, 1998, 281: 690– 692.

Genetic Diversity of *Chiloscyllium plagiosum* in China's Southern Coast

CHEN Xiao, YANG Shengyun*, PAN Cong

(College of Oceanography and Environmental Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: Random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique was used to assess genetic diversity and population structure within and among three *Chiloscyllium plagiosum* stocks from Mindong (MN), Minnan (MN) and Yuxi (YX) of China's southern coast. Thirty-four primers produced 316 loci in all samples. There were 308, 308 and 303 loci in three stocks respectively, in which 49 (15.90%), 52 (16.88%) and 42 (13.86%) were polymorphic. Shannon genetic diversity indices of three stocks (0.099 8, 0.105 5, 0.093 6) indicates that genetic diversity of *C. plagiosum* is low. In addition, the results of UPGMA cluster analysis and Nei's genetic distances showed that gene exchange between *C. plagiosum* stocks fits Isolation By Distance Model and genetic differences among stocks correlates to their geographical distance. Using analysis of molecular variance (AMOVA), weak but significant population differentiation was detected with a global fixation index ($F_{ST} = 0.044\ 04$, $p < 0.05$). It meaning that the greater variance occurred among populations (95.60%) and lesser variance within populations (4.402%).

Key words: *Chiloscyllium plagiosum*; genetic diversity; AMOVA; RAPD