

贵州疣螈 D-loop 区和 tRNA^{Phe} 序列变异 及群体遗传多样性

肖羽 陈光照 谷晓明*

(贵州师范大学生命科学学院 贵阳 550001)

摘要: 贵州疣螈 (*Tylototriton kweichowensis*) 是我国特有的国家 II 级保护动物, 分布面积极为狭窄。为了解其遗传多样性现状, 作者采获了几乎覆盖其分布范围的 12 群体的 58 个体的材料, 测定了线粒体 D-loop 区 (mtDNA 控制区) 及 tRNA^{Phe} 基因全序列共 808 bp, 发现 16 个变异位点, 定义了 26 个单元型。遗传多样性检测显示, 贵州疣螈种群具有高的单元型多样性和低的核苷酸多样性。Tajima's D 和 Fu and Li's D 值检测结果均表明, 贵州疣螈种群相对于中性进化的歧异度并没有明显的偏离。系统发育及网络进化分析没有显示出单元型和地理位置的对应关系, 各群体的单元型都相互散布在不同的分布群中, 呈现一种混杂的分布格局。水域群体与其他任一群体间基因流 $N_m < 1$, 有分化的迹象。总的来说, 贵州疣螈各群体之间没有发生极显著的遗传分化, 因此建议将贵州疣螈所有群体作为一个整体管理单元加以保护。

关键词: 贵州疣螈; D-loop 区; tRNA^{Phe} 基因; 遗传多样性; 基因流

中图分类号: Q951 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2010) 03-21-09

Sequence Variation of Mitochondrial DNA D-loop including tRNA^{Phe} and Population Genetic Diversity of *Tylototriton kweichowensis*

XIAO Yu CHEN Guang-Zhao GU Xiao-Ming*

(School of Life Sciences, Guizhou Normal University, Guiyang 550001, China)

Abstract: *Tylototriton kweichowensis* is endemic to China and is listed as a category II species of the state key protected wildlife. Its distribution area is extremely limited. To study the genetic diversity and its genetic variation of *T. kweichowensis* populations, we sequenced the complete mitochondrial DNA D-loop (mtDNA control region) and tRNA^{Phe} of 58 samples obtained from 12 populations. Only 16 variable sites were detected in the nucleotide sequences of 808 bp, and 26 haplotypes were identified. *T. kweichowensis* populations have high haplotype diversity and low nucleotide diversity. Neither the estimate of Tajima's D nor that of Fu and Li's D deviated significantly from the neutral selection hypothesis for 12 populations. Phylogenetic trees and Median joining Network analysis demonstrated that all the haplotypes could not be clustered to corresponding geographic clades, but showed disordered distribution pattern. There are signs of genetic divergence between Shuicheng population and anyone of others, according to gene flow $N_m < 1$. In general, there is no distinctive genetic

基金项目 贵州省教育厅自然科学研究项目 (No. 黔教科 (2007) 017), 贵州省国际科技合作重点项目 (No. 黔科合外 G 字 (2008) 700116);

* 通讯作者, E-mail: gxmswx@263.net;

第一作者介绍 肖羽, 女, 硕士研究生; 研究方向: 分子系统学; E-mail: xiao-yu2@126.com.

收稿日期: 2009-10-10, 修回日期: 2010-03-02

divergence among its populations.

Key words: *Tylototriton kweichowensis*; mtDNA D-loop; tRNA^{Phe} gene; Genetic diversity; Gene flow

贵州疣螈 (*Tylototriton kweichowensis*) ,1932年由方炳文和张孟闻所命名^[1],隶属两栖纲 (Amphibia) 有尾目 (Caudata) 蝾螈科 (Salamandridae),为我国Ⅱ级保护动物,是我国特有种^[2]。该动物的分布区域较为狭窄,主要分布于贵州西部和西北部的水城、威宁、赫章、毕节、大方、纳雍、织金、黔西、金沙,以及云南东北部的彝良、永善^[3],以赫章、毕节、大方为分布中心^[4]。

随着乡镇企业蓬勃兴起,贵州疣螈的生存环境遭到严重破坏与污染,成螈正逐渐丧失生存场所,卵与幼螈的正常发育也受到严重影响,栖息地环境的恶化和种群大小剧烈变动容易导致其种群遗传多样性的丧失;遗传多样性的丧失对物种生存带来直接的不利影响,可以使物种更加容易灭绝^[5-7]。Frankham指出近交衰退和小种群遗传变异的丧失,是造成物种灭绝的重要原因^[8]。遗传多样性是评价一个物种进化潜力高低、抵制自然界各种生存压力能力强弱的重要遗传学指标^[9-11],是针对濒危物种制定有效保护策略和保护计划的最为重要的科学依据之一。早在1998年,贵州疣螈被列入

“中国濒危动物红皮书:两栖类和爬行类”^[12]。

线粒体DNA (mtDNA) D-环 (D-loop) 是线粒体基因组的非编码区,亦称控制区,属于遗传高变区,富含A、T,进化速度快,多态性丰富,是研究种内遗传结构、遗传多样性、瓶颈效应等最有效的区域^[5,13]。线粒体 tRNA^{Phe} 基因位于 D-loop 与 12S rRNA 基因之间,由重链 DNA 编码。许多学者对贵州疣螈形态、生态、生理和细胞等方面作了相关报道,但未见对其 mtDNA 水平上种群遗传多样性的研究报道。本文对贵州疣螈不同群体的 D-loop 全序列及其相邻的 tRNA^{Phe} 全序列变异情况和地理群体遗传多样性进行分析研究,以为保护其遗传多样性和探索种内的系统发育提供资料。

1 材料与方法

1.1 样品采集 本研究于2008~2009年采集了覆盖贵州和云南两省共9个县12群体的58个个体的贵州疣螈样品,采用非伤害性采样法,即捕捉后,剪其尾端约1cm组织后放生,得到的样品以75%~80%的酒精浸泡保存于-25℃冰箱中。样品采集信息详见表1和图1。

表1 贵州疣螈样本数和采集地资料

Table 1 Sample numbers and collection sites of *Tylototriton kweichowensis*

| 群体 Population | 个体数 Sample number | 采集地 Collection sites | 经、纬度 Longitude and Latitude | 海拔 Altitude (m) |
|------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------------|-----------------------|
| 洛泽河 Luozehe | 10 | 云南省彝良县洛泽河镇 | 103°58'E, 27°29'N | 1 921 |
| 观风海 Guanfenghai | 5 | 贵州省威宁县观风海镇 | 103°59'E, 26°57'N | 2 295 |
| 财神 Caishen | 7 | 贵州省赫章县财神镇 | 104°36'E, 27°12'N | 1 784 |
| 水塘堡 Shuitangbao | 2 | 贵州省赫章县水塘堡乡 | 104°39'E, 27°05'N | 1 827 |
| 水城 Shuicheng | 7 | 贵州省水城县郊 | 104°57'E, 26°32'N | 1 799 |
| 羊场 Yangchang | 2 | 贵州省纳雍县羊场苗族彝族乡 | 105°03'E, 27°02'N | 1 604 |
| 鬃岭 Zongling | 2 | 贵州省纳雍县鬃岭镇 | 105°15'E, 26°47'N | 1 851 |
| 对坡 Duipo | 4 | 贵州省毕节市对坡镇 | 105°18'E, 27°28'N | 1 617 |
| 鸭池 Yachi | 2 | 贵州省毕节市鸭池镇 | 105°21'E, 27°16'N | 1 440 |
| 金坡 Jinpo | 5 | 贵州省黔西县金坡乡 | 105°56'E, 27°10'N | 1 447 |
| 大水 Dashui | 7 | 贵州省大方县大水乡 | 106°00'E, 27°15'N | 1 517 |
| 安洛 Anluo | 5 | 贵州省金沙县安洛乡 | 106°06'E, 27°20'N | 1 452 |

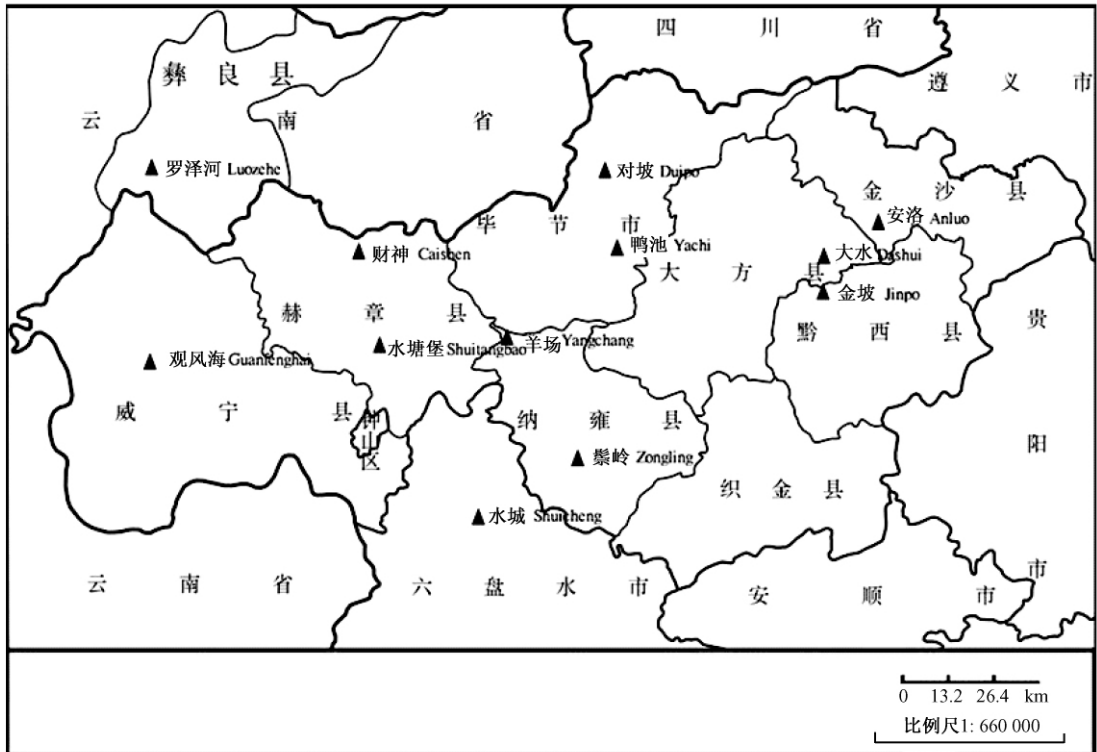


图 1 贵州疣螈的样品采集地示意图

Fig. 1 The sampling sites of *Tylototriton kweichowensis*

▲为采样点。▲ Represents sampling sites.

1.2 实验方法

1.2.1 总 DNA 提取 采用常规的酚氯仿抽提法,取约 50 mg 样品,剪碎,蛋白酶 K 消化过夜,饱和酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)抽提 2 次,氯仿:异戊醇(24:1)抽提一次,异丙醇(-20℃)沉淀和 70% 的乙醇洗涤,烘干后 TE 溶解。

1.2.2 PCR 扩增 利用引物 L-Pro-ML (5'-GGCACCCAAGGCCAAAATTCT-3')和 H-12S₁-ML (5'-CAAGGCCAGGACCAAACCTTTA-3')^[14]对贵州疣螈及作为外群的细痣疣螈(*T. asperrimus*)、大凉疣螈(*T. taliangensis*)的 mtDNA D-loop 和 tRNA^{Phe} 进行扩增。PCR 扩增在 PTC-200 Peltier Thermal Cycle DNA 扩增仪(Bio-Rad Laboratories, Inc. USA)上进行。

扩增体积为 50 μl:25 μl Premix TaqE(包括 TaqE、10 × loading buffer、dNTP 和 Mg²⁺)、去

离子水 20 μl,正反引物(10 μmol/L)各 2 μl 模板 DNA (200 ~ 500 ng/μl) 1 μl。热循环流程为:95℃ 预变性 5 min;32 个循环,包括 94℃ 变性 30 s,50℃ 退火 1 min,72℃ 延伸 1 min;72℃ 总延伸 10 min。反应产物进行电泳检测。

1.2.3 测序和序列数据分析 PCR 产物纯化和序列测定由上海鼎安生物科技有限公司完成。所得序列经 NCBI 搜索后,分析其相似性,从而甄别序列。对 ABI 文件人工校正后使用 BioEdit 对序列编辑、排序、比对。用 MEGA 4.1 统计序列的碱基组成、多态位点和转换与颠换比。用 DnaSP 4.0 确定单元型,计算单元型多样性指数、核苷酸多样性、平均核苷酸差异数等。用 Arlequin 3.1 中的分子方差分析(AMOVA)估算群体间分化程度参数(F_{st}),并用排列测验法(permutation test)检验 F_{st} 显著性(重复次数为 1 000)。通过 F_{st} 估算种群间基

因流 $N_m : N_m = (1/F_{st} - 1) / 2$ 。

在 PAUP* 4.0b10 软件上用最大简约法 (maximum parsimony, MP) 和邻接法 (neighbour joining, NJ) 构建单元型的系统发生树, 采用重复抽样分析 1 000 次检验分子系统树各分枝的置信度。构树时用贵州疣螈的近缘种细痣疣螈和大凉疣螈 (GenBank 登录号分别为 GU012650 和 GU012651) 的同源序列作为外群^[15], 以获取系统树的根。应用软件 NETWORK 4.5.1.0, 采用中介网络分析法 (median joining) 对贵州疣螈 D-loop 区及 tRNA^{Phe} 序列定义的单元型进行了网络进化分析。

2 结果

2.1 贵州疣螈群体 D-loop 基因序列变异 共获得贵州疣螈 58 个个体的 mtDNA D-loop 区全序列 737 bp 和 tRNA^{Phe} 基因全序列 71 bp, 共 808 bp; D-loop 区 A、T、G、C 的平均含量分别为 27.8%、34.3%、21.4% 和 16.5%; tRNA^{Phe} 序列 A、T、G、C 的平均含量分别为 44.3%、28.6%、

14.3% 和 12.8%。

分析了 D-loop 区和 tRNA^{Phe} 总共 808 个位点后, 发现了 16 个多态性变异位点, 约占总分析位点的 1.98%, 包括 11 个简约信息位点, 5 个插入/缺失位点, 碱基的转换颠换之比 (Ts/Tv) 为 1.363, 可见碱基替换中, 转换和颠换相当, 表现出较低的转换偏倚 (bias)。另外, 16 个变异位点中, 10 个在 D-loop 区, 占该区位点的 0.81%, 6 个在 tRNA^{Phe} 序列中, 占该基因位点的 8.45%, tRNA^{Phe} 基因序列变异明显多于 D-loop 区。

2.2 贵州疣螈群体的遗传多样性参数 贵州疣螈各群体的遗传多样性参数见表 2。各群体的变异位点都较少, 仅有 1~2 个; 平均核苷酸差异数及核苷酸多样性指数均较低, 分别在 0.000 0~3.000 0 之间和 0~0.003 73 之间; 就各群体的单元型数而言, 最少的是水城、羊场和鸭池群体, 仅有 1 个, 表现为较低的单元型多样性指数 0.000, 其余群体单元型数为 2 个以上, 表现出较高的单元型多样性指数, 为 0.800~1.000 之间。

表 2 贵州疣螈 12 群体的 D-loop 及 tRNA^{Phe} 基因遗传多样性参数

Table 2 Genetic diversity parameters of mtDNA D-loop and tRNA^{Phe} gene fragments of *Tylotriton kweichowensis*

| 群体 Population | 个体数 Sample number | 多态位点 Polymorphic sites | 平均核苷酸差异数 Average number of nucleotide differences | 核苷酸多样性指数 Nucleotide diversity index | 单元型个数 Number of haplotype | 单元型多样性 Haplotype diversity |
|------------------|----------------------|---------------------------|--|--|------------------------------|-------------------------------|
| 洛泽河 Luozehe | 10 | 2 | 2.356 | 0.002 92 | 5 | 0.800 |
| 观风海 Guanfenghai | 5 | 2 | 1.400 | 0.002 24 | 4 | 0.900 |
| 财神 Caishen | 7 | 2 | 1.048 | 0.001 30 | 6 | 0.952 |
| 水塘堡 Shuitangbao | 2 | 2 | 3.000 | 0.003 73 | 2 | 1.000 |
| 水城 Shuicheng | 7 | 2 | 0.000 | 0.000 00 | 1 | 0.000 |
| 羊场 Yangchang | 2 | 2 | 0.000 | 0.000 00 | 1 | 0.000 |
| 鬃岭 Zongling | 2 | 2 | 0.000 | 0.000 00 | 2 | 1.000 |
| 对坡 Duipo | 4 | 1 | 0.500 | 0.000 62 | 3 | 0.833 |
| 鸭池 Yachi | 2 | 1 | 0.000 | 0.000 00 | 1 | 0.000 |
| 金坡 Jinpo | 5 | 1 | 1.000 | 0.001 24 | 4 | 0.900 |
| 大水 Dashui | 7 | 1 | 2.000 | 0.002 48 | 6 | 0.952 |
| 安洛 Anluo | 5 | 2 | 1.000 | 0.001 24 | 4 | 0.900 |

对贵州疣螈 58 条 D-loop 区、tRNA^{Phe} 同源序列的 16 个多态位点分析后得到 26 个单元型, 其分布见表 3。贵州疣螈的 12 个群体没有共享单元型, 也没有明显的主体单元型, 仅水城

群体只产生一个单元型 (Hap 26) 而且是特有单元型的群体, 其余群体的单元型共享和特有情况没有明显的特征。

表 3 26 个单元型及其在贵州疣螈 12 个群体中的分布
Table 3 Distribution of 26 haplotypes in 12 groups

| 单元型 Haplotype | 变异位点 Variation position | 洛 泽 河 | 观 风 海 | 财 神 | 水 塘 堡 | 水 城 | 羊 场 | 鬃 岭 | 对 坡 | 鸭 池 | 金 坡 | 大 水 | 安 洛 | 总计 Total | 登录号 GenBank accession number |
|------------------|-----------------------------------|-------------|-------------|--------|-------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-------------|---------------------------------------|
| | 1 3 3 4 4 4 6 6 7 7 7 7 7 8 | | | | | | | | | | | | | | |
| | 4 5 2 1 3 3 3 2 9 5 5 6 6 8 0 | | | | | | | | | | | | | | |
| | 9 8 8 9 9 0 1 2 6 1 1 3 3 4 2 3 | | | | | | | | | | | | | | |
| Hap 1 | — A C A — T A A T T T A A T G C | | | | 1 | | 2 | | | | | | | 3 | GU012652 |
| Hap 2 | — · · · — · · · · C · — · C · T | | | 1 | 1 | | | | | | | | | 2 | GU012653 |
| Hap 3 | — · A · — · · · · · — · · · T T | | | | | | | 1 | | | | | | 1 | GU012654 |
| Hap 4 | — · A · — · · · · · · · · T T | | | | | | | 1 | | | | | | 1 | GU012655 |
| Hap 5 | — · · · T · · · · · · · · · T | | | | | | | | 2 | 2 | | | | 4 | GU012656 |
| Hap 6 | C · · · — · · · · · · · · · T | | | 1 | | | | | | | 2 | 2 | | 5 | GU012657 |
| Hap 7 | C · · · — · T · — · — · · · · T | | | | | | | | | | 1 | | 1 | 2 | GU012658 |
| Hap 8 | — T · · — · · · · — · — · · · · T | | | | | | | | | | 1 | | | 1 | GU012659 |
| Hap 9 | C T · · — · · · · — · — · · · · T | | | | | | | | | | 1 | | | 1 | GU012660 |
| Hap 10 | C T · · — · · · · — C · · G C · · | | | | | | | | | | | 1 | | 1 | GU012661 |
| Hap 11 | — · · · — · · · · — C · — G C · T | | | | | | | | | | | 1 | | 1 | GU012662 |
| Hap 12 | — · · · — · · · · — · · · · · T | | 1 | | | | | | | | | 1 | | 2 | GU012663 |
| Hap 13 | — · · · — · · · · — · — · · · · T | | | 1 | | | | | | | | 1 | 2 | 4 | GU012664 |
| Hap 14 | — · · · — · · · · · · · · · · T | | | 2 | | | | | 1 | | | 1 | | 4 | GU012665 |
| Hap 15 | — · · C — C · G · · · — · · · T | 3 | 2 | | | | | | | | | | | 5 | GU012666 |
| Hap 16 | — · · C — · · G · · · — · · · T | | 1 | | | | | | | | | | | 1 | GU012667 |
| Hap 17 | — · · C — C · G — · · — · · · T | | 1 | | | | | | | | | | | 1 | GU012668 |
| Hap 18 | — · · · — · · · · — C · · · C · T | | | 1 | | | | | | | | | | 1 | GU012669 |
| Hap 19 | — · · · — · · · · C · · · · · T | | | 1 | | | | | | | | | | 1 | GU012670 |
| Hap 20 | — · · · — · · · · — · · · · · T | | | | | | | | | | | | 1 | 1 | GU012671 |
| Hap 21 | C T · · — · T · — · — · · · · T | | | | | | | | | | | | 1 | 1 | GU012672 |
| Hap 22 | — T · · — · · · · · · · · · T | 1 | | | | | | | 1 | | | | | 2 | GU012673 |
| Hap 23 | — · · · — · · · · C · — · · · T | | | | | | | | | | | | | 4 | GU012674 |
| Hap 24 | — · · C — C · G · · · · · · T | 1 | | | | | | | | | | | | 1 | GU012675 |
| Hap 25 | — · · · — · · · · — C · — · · · T | | | | | | | | | | | | | 1 | GU012676 |
| Hap 26 | — · · · — · · · · · · · — · · · T | | | | | | 7 | | | | | | | 7 | GU012677 |

数字 (纵向) 表示单元型的变异位点, “—” 表示碱基的缺失, “·” 表示与第一个单元型 (Hap 1) 有相同的碱基组成。群体中文名称对应的英文参见表 2。

Numbers (vertical) show the variation positions among *Tyotriton kweichowensis* haplotype. “—” represents gaps / missing data sites. Variable sites are identified within 808 bp sequence where a “·” represents identity with haplotype Hap-1. English name of all populations see the table 2.

2.3 遗传分化和基因流 12 个群体间的遗传分化指数 (F_{st}) 在 0.000 00 ~ 1.000 00 之间 (表 4), 遗传分化指数最小的是水塘堡群体与羊场群体、水塘堡群体与鬃岭群体之间, 都为 0, 即无分化; 其次是安洛群体与大水群体之间, 为 0.015 87; 而水城与羊场、水城与鸭池、羊场与鸭池之间的遗传分化指数达到最大值 1。

贵州疣螈 12 群体间的基因流见表 4, 由于水塘堡群体和羊场群体、鬃岭群体之间的 F_{st} 值为 0, 用公式 $N_m = (1/F_{st} - 1) / 2$ 来估算基因流失去意义, 但根据公式近似值的推算, 可以认为这两组对间的 N_m 趋向于无穷大。在其余计算出的组对中, 基因流总体来说是比较丰富的, 但两两组对间差异较大, 安洛群体和大水群体

表 4 贵州疣螈 12 群体间的遗传分化指数 (F_{st}) 和基因流 (N_m)

Table 4 Fixtion index (F_{st}) and migration rates (N_m) among twelve *Tylototriton kweichowensis* groups

| 群体 | 洛泽河 | 观风海 | 财神 | 水塘堡 | 水城 | 羊场 | 鬃岭 | 对坡 | 鸭池 | 金坡 | 大水 | 安洛 |
|-----|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|----------|-----------|-----------|-----------|----------|-------|
| 洛泽河 | | 11.74 | 3.38 | 2.84 | 0.41 | 0.85 | 2.85 | 2.51 | 0.85 | 2.67 | 3.18 | 2.67 |
| 观风海 | 0.040 85 | | 6.45 | 6.76 | 0.31 | 0.93 | 6.76 | 3.32 | 0.93 | 4.50 | 10.68 | 4.50 |
| 财神 | 0.128 81* | 0.071 90 | | 11.57 | 0.45 | 1.24 | 14.31 | 15.94 | 1.24 | 3.10 | 7.75 | 3.10 |
| 水塘堡 | 0.149 83 | 0.068 83 | -0.041 14 | | 0.10 | +∞ | +∞ | 4.00 | 0.50 | 6.76 | 14.31 | 6.76 |
| 水城 | 0.547 90* | 0.616 32* | 0.523 81* | 0.831 33* | | 0.00 | 0.10 | 0.22 | 0.00 | 0.31 | 0.45 | 0.31 |
| 羊场 | 0.370 63* | 0.350 18 | 0.287 53 | 0.000 00 | 1.000 00* | | 0.50 | 0.69 | 0.00 | 0.93 | 1.24 | 0.93 |
| 鬃岭 | 0.149 38 | 0.068 83 | 0.033 77 | 0.000 00 | 0.831 33* | 0.500 00 | | 4.00 | 0.50 | 6.76 | 14.31 | 6.67 |
| 对坡 | 0.166 13 | 0.131 05 | 0.030 41 | 0.111 11 | 0.694 99* | 0.420 29 | 0.111 11 | | 5.67 | 5.67 | 7.09 | 5.67 |
| 鸭池 | 0.370 63* | 0.350 18 | 0.287 53 | 0.500 00 | 1.000 00* | 1.000 00 | 0.500 00 | -0.081 08 | | 0.93 | 1.24 | 0.93 |
| 金坡 | 0.157 57* | 0.100 00 | 0.158 70 | 0.068 83 | 0.616 32* | 0.350 18 | 0.068 83 | 0.131 05 | 0.350 18* | | 10.06 | 7.50 |
| 大水 | 0.128 81* | 0.044 71 | -0.060 61 | 0.033 77 | 0.523 81* | 0.287 53* | 0.033 77 | 0.065 85 | 0.287 53 | -0.047 37 | | 31.01 |
| 安洛 | 0.157 57* | 0.100 00 | 0.158 70 | 0.068 83 | 0.616 32* | 0.350 18 | 0.068 83 | 0.131 05 | 0.350 18 | 0.062 56 | 0.015 87 | |

对角线上方为 12 群体间的基因流 (N_m)，对角线下方为遗传分化指数 (F_{st})，"*" 表示显著差异 ($P < 0.05$)。群体中文名称对应的英文参见表 2。

Above the diagonal: migration rates (N_m), Below the diagonal: F_{st} values based on haplotype frequencies. * Mean significance ($P < 0.05$). English name of all populations see the table 2.

间的基因流最丰富,为 31.01,而水城与鸭池、水城与羊场、鸭池与羊场 3 个组对间却无基因流 ($N_m = 0$)。

2.4 歧点分布和中性检验 贵州疣螈种群歧点分布统计分析结果呈单峰图(图 2),表明其种群在最近经历了种群爆发和种群扩张;同时,

Fu's F_s 检验结果 ($F_s = -3.925$) 也表明,贵州疣螈种群经历了一个强的种群增长和扩散,近期存在遗传变异。Tajima's D 和 Fu and Li's D 值检测结果表明,贵州疣螈种群相对于中性进化的歧异度,并没有明显的偏离,具有相对稳定的种群结构 ($P > 0.05$)。

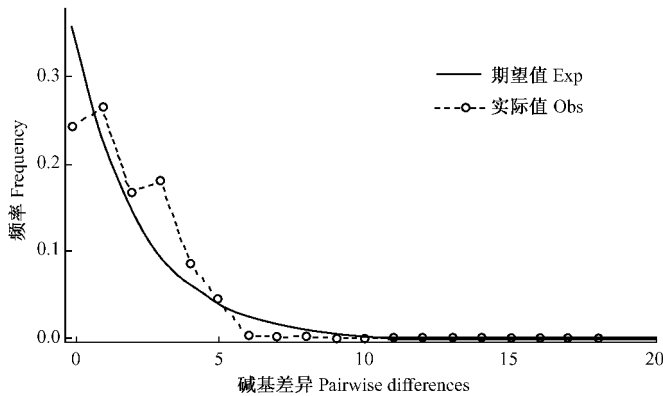


图 2 贵州疣螈总体样本的歧点分布分析

Fig. 2 Distribution of the number of pairwise differences in total *Tylototriton kweichowensis* samples

2.5 分子系统发育和网络进化分析 用 MP 法和 NJ 法构建了贵州疣螈线粒体控制区及 tRNA^{Phe} 序列共 808 个位点定义的 26 个单元型的系统发生树(图 3),MP 树和 NJ 树一致性地显示:种群内和种群间的 26 个单元型并没有形成明显的群组,各种群中的单元型都相互散布在不同的分布群中,呈现一种混杂的分布格局。

中介网络进化分析(图 4)显示,贵州疣螈单元型没有分为明显支系,各群体混杂在一起,没有显示出地理位置和单元型的对应关系,支持 MP 树和 NJ 树的分析结果;Hap 14 位于网络图的中心,推测这个单元型可能是较为原始的,其他单元型由其衍生而来。

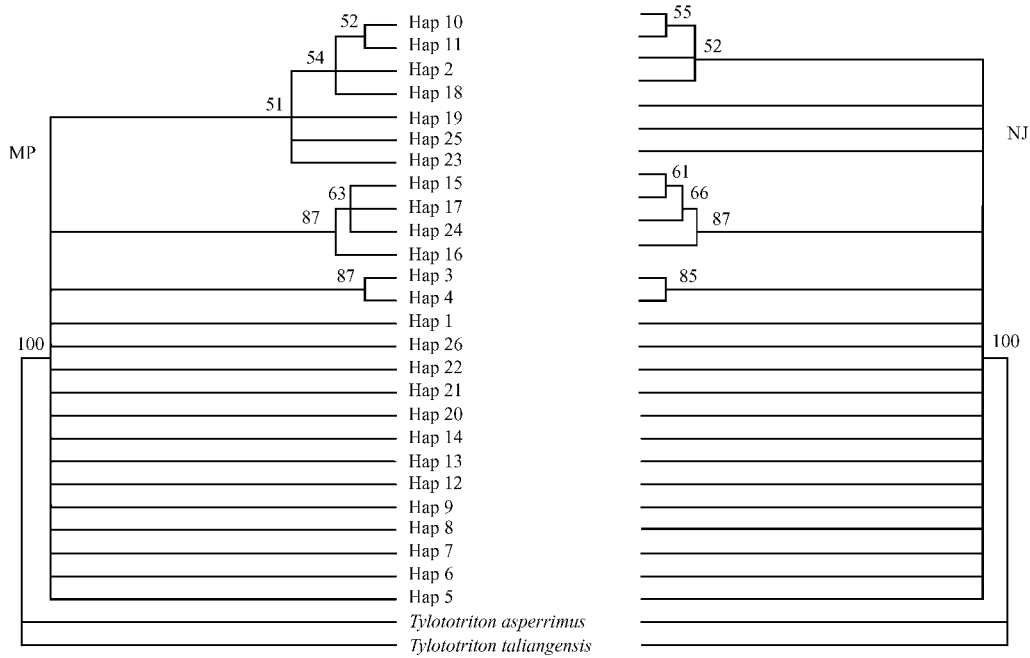


图 3 贵州疣螈 D-loop 区和 tRNA^{phe} 基因全序列定义的 26 个单元型的 MP 和 NJ 系统发生树

Fig. 3 The MP and NJ phylogenetic trees of *Tylototriton kweichowensis*'s 26 haplotypes based on mtDNA D-loop and tRNA^{Phe} gene

树枝处的数字为自引导值 (Bootstrap), 重复次数为 1 000; 字母代码表示不同的单元型 (同表 3)。

Numbers at notes indicated the statistical support obtained from 1 000 bootstrap replicates.

3 讨 论

通常认为线粒体控制区富含 A、T, 属于遗传高变区, 多态性丰富。本研究显示, 贵州疣螈 D-loop 区 A + T (62.1%) 含量确实明显高于 G + C (37.9%) 含量; 但在变异位点中, 发生在 D-loop 区的多态位点仅占该区位点的 0.81%, 而发生在 tRNA^{phe} 序列中的多态位点占该基因位点的 8.45%。由此看来, D-loop 区的多态性不如 tRNA^{phe} 基因的多, 这是其物种固有的特殊性还是其遗传漂变的结果目前尚不清楚, 还有待进一步研究。

遗传多样性对物种的生存具有重要的意义。贵州疣螈 58 个体的 58 条 D-loop 及 tRNA^{phe} 同源序列的 808 个分析位点中, 仅有 16 个变异位点, 占序列分析位点的 1.98%, 插入/缺失位点 5 个, 出现明显的碱基插入/缺失现象, 说明序列的突变并非发生在近期^[16]; 对贵

州疣螈总的 12 群体而言, 单元型数为 26, 单元型多样性为 0.686, 核苷酸多样性为 0.002 24, 即贵州疣螈种群有相对较多的单元型数目和较低的核苷酸多样性^[17]。这种较高的单元型数和较低核苷酸多样性值表明, 贵州疣螈种群可能由一个较小的有效种群迅速增长^[18], 虽然通过变异积累了单元型的多态性, 但却还未能积累核苷酸序列的多样化^[19]。因此我们推测贵州疣螈在进化历史上可能经历过瓶颈效应 (bottle neck effect), 但种群中这种很低的核苷酸多样性也可能是生境的破碎化以及多种历史原因的综合结果^[17]。Tajima's D 和 Fu and Li's D 值检测结果均表明, 贵州疣螈种群相对于中性进化的歧异度并没有明显的偏离, 具有较为稳定的种群结构 ($P > 0.05$)。

未检测到贵州疣螈 12 群体共享的单元型, 仅水城群体产生一个特有单元型 (Hap 26)。但 MP 树和 NJ 树显示, Hap 26 并没有形成独立

貌切割深,山岳屏障和人类干扰(如公路的修建等)等有关。

贵州疣螈是我国所特有的一个物种,由于其分布较为狭窄,长期以来对贵州疣螈种群的数量、分布特别是种群的遗传变异缺乏深入了解。随着人类活动的影响,贵州疣螈的栖息地不断缩小和破碎化,水平分布成点状或片状^[4],种群数量也日益减少。本研究结果表明,贵州疣螈各群体之间没有发生极显著的遗传分化,因此建议将贵州疣螈所有群体作为一个整体的管理单元加以保护^[16]。

致谢 采样得到了六盘水师范学院田应洲教授、毕节学院王延斌教授,以及肖树林、郝茂贤、宋芝、顾怀江、薛光虎等人士的大力帮助;实验过程中得到本实验室研究生王会、宋华的帮助,特此一并致谢。

参 考 文 献

- [1] Fang P W, Chang M Y. Notes on *Tylototriton kweichowensis*, sp nov and *asperimus* Unterstein with synopsis to species. *Sinensia*, 1932 2:111 - 122.
- [2] 赵尔宓. 中国两栖动物地理区划. *四川动物*, 1995, (增刊): 3 - 14.
- [3] 费梁, 胡淑琴, 叶昌媛, 等. 中国动物志: 两栖纲(上卷). 北京: 科学出版社 2006 268 - 272.
- [4] 王延斌, 魏明松. 贵州疣螈在贵州西部、西北部的分布现状及环境影响. *毕节师范高等专科学校学报*, 1999, 3:17 - 19.
- [5] David D D, Turner B J. Evolutionary genetics of death valley pupfish populations: Mitochondrial DNA sequence variation and population structure. *Molecular Ecology*, 1998, 7: 279 - 288.
- [6] Saccheri I, Kuussaari M, Kankare M et al. Inbreeding and extinction in a butterfly metapopulation. *Nature*, 1998, 392:491 - 494.
- [7] Soule M E, Hillis L S. No need to isolate genetics. *Science*, 1998 282:1658 - 1659.
- [8] Frankham R. Inbreeding and extinction: island populations. *Conservation Biology*, 1998, 12:665 - 675.
- [9] Frankham R. Conservation genetics. *Annual Review of Genetics*, 1995 29:305 - 327.
- [10] Frankham R, Ralls K. Conservation biology: inbreeding leads to extinction. *Nature*, 1998, 392:441 - 442.
- [11] Frankham R, Ballou J D, Briscoe D A. Introduction to Conservation Genetics. Cambridge: Cambridge University Press 2002 78 - 104.
- [12] 赵尔宓. 中国濒危动物红皮书: 两栖类和爬行类. 北京: 科学出版社, 1998 38 - 55.
- [13] Rosel P E, Block B A. Mitochondrial control region variability and global population structure in the swordfish *Xiphias gladius*. *Marine Biology*, 1996, 125:11 - 22.
- [14] Steinfartz S, Veith M, Tautz D. Mitochondrial sequence analysis of *Salamandra taxa* suggests old splits of major lineages and postglacial recolonizations of Central Europe from distinct source populations of *Salamandra salamandra*. *Molecular Ecology* 2000 9:397 - 410.
- [15] Weisrock D W, Papenfuss T J, Macey J R, et al. A molecular assessment of phylogenetic relationships and lineage accumulation rates within the family Salamandridae (Amphibia, Caudata). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 2006 41:368 - 383.
- [16] Quinn T W, Wilson A C. Sequence evolution in and around the mitochondrial control region in birds. *Journal of Molecular Evolution*, 1993 37:417 - 425.
- [17] 柳杨, 李进华, 赵健元. 黄山短尾猴 mtDNA 控制区序列变异及种群的遗传多样性. *动物学报* 2006 52(4):724 - 730.
- [18] 李明, 蒙世杰, 魏辅文, 等. 羚牛的遗传多样性及其种群遗传结构分析. *兽类学报* 2003 23(1):10 - 16.
- [19] Avise J C. Phylogeography the History and Formation of Species. Cambridge, Massachusetts London, England: Harvard University Press 2000.
- [20] 郭丽. 中日水域江豚 mtDNA 分子系统地理学和种群历史研究及中国水域江豚不同时期遗传多样性的变化分析. 南京: 南京师范大学生命科学学院遗传资源研究所硕士学位论文 2006 24 - 27.
- [21] Fu Y X. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 1997, 147(2):915 - 925.
- [22] Su B, Fu Y X, Wang Y X. Genetic diversity and population history of the red panda (*Ailurus fulgens*) as inferred from mitochondrial DNA sequence variations. *Mol Biol Evo*, 2001, 18(6):1070 - 1076.
- [23] 程宏毅, 鲍毅新, 陈良, 等. 黑麂——皖浙分布中心种群的遗传多样性. *动物学报* 2008 54(1):96 - 103.
- [24] Allendorf F W. Gene flow and genetic differentiation among populations. *Genetics and Conservation*, 1983, 18(3):51 - 65.
- [25] David P. Hetemzygosity-fitness correlations: new perspectives on old problems. *Heredity*, 1998, 80:531 - 537.