

尾斑瘰螈种群的 D-loop 区遗传多样性分析

陈光照 肖羽 陈学平 谷晓明*

贵州师范大学生命科学学院 贵阳 550001

摘要: 以线粒体 DNA D-loop 序列为分子标记,研究了采自雷公山和武陵山的尾斑瘰螈 (*Paramesotriton caudopunctatus*) 5 个种群的遗传多样性。获得 42 个个体 mtDNA D-loop 区序列,长度为 690 bp,其中有 30 个变异位点,由此定义了 13 个单倍型。5 个种群中未出现共享单倍型的现象。尾斑瘰螈种群有相对较多的单倍型数 (H_d) 和较低的核苷酸多样性 (P_i)。遗传分化指数 (F_{ST})、核苷酸歧异度 (D_{xy}) 和基因流 (N_m) 分析表明,雷公山的 3 个种群与武陵山的 2 个种群间有了一定程度分化。从系统进化树来看,各单倍型按照地理分布聚合,雷公山的 3 个种群构成一支,武陵山的 2 个种群构成另一支。建议将雷公山种群、武陵山种群分别作为 2 个不同单元进行保护。

关键词: 尾斑瘰螈;地理种群;D-loop 区;遗传多样性

中图分类号:Q346 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2011)03-55-09

Genetic Diversity Analysis of D-loop Region in Populations of *Paramesotriton caudopunctatus*

CHEN Guang-Zhao XIAO Yu CHEN Xue-Ping GU Xiao-Ming*

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

Abstract: We studied the genetic diversity of five populations of *Paramesotriton caudopunctatus* using D-loop sequence of mtDNA as a molecular marker. As a result, we obtained 690 bp long D-loop sequences of 42 samples from five populations collected from Leigongshan and Wulingshan. In the sequences, there were 30 variable sites. Based on these sites 13 haplotypes are defined. No shared haplotype was found among the five populations. *P. caudopunctatus* populations had high haplotype diversity and low nucleotide diversity. The results of fixation index (F_{ST}), nucleotide diversity (D_{xy}) and migration rates (N_m) analyses indicated that a certain extent differentiation occurred between Leigongshan population and Wulingshan population. In phylogenetic trees, all haplotypes were clustered according to their geographic distribution. Three populations from Leigongshan constituted one clade, while the other two populations from Wulingshan constituted another clade, supporting the treatment of Leigongshan and Wulingshan populations as two separate management units.

Key words: *Paramesotriton caudopunctatus*; Population; D-loop region; Genetic diversity

尾斑瘰螈 (*Paramesotriton caudopunctatus*) 是我国特有的有尾两栖动物,隶属于蝾螈科瘰螈属,仅分布于贵州的雷山县和武陵山系的贵州江口县、重庆的酉阳县,以及湖南和广西两省交界的都庞岭地区。该种主要生活在海拔 800 ~ 1 900 m 的林区山溪内,以捕食小型动物为食。捕食有害动物种类为有益动物的 2.3 倍,

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 陈光照,男,硕士研究生;研究方向:两栖类分子系统学; E-mail: reeky1209@21cn.com。

收稿日期:2010-11-04, 修回日期:2011-03-14

捕食有害动物的数量为有益动物数量的 2.8 倍,有益系数为 43.9%^[1]。已被列入中国国家林业局 2000 年颁布的《国家保护的有益的或者有重要经济、科学研究价值的陆生野生动物名录》^[2]。

在瘰螈属的系统发育中,尾斑瘰螈是一个非常物种。Sparreboom 对尾斑瘰螈的形态、生殖行为和产卵方式进行了研究报道^[3],在此基础上,Freytag 依据尾斑瘰螈头骨狭长,骨化较弱,头背骨质脊棱发育普遍较差,吻极宽扁的鉴别特征,将其订为一新属 *Allomestriton*^[4]。庞家庆等依据形态学研究,认为 *Allomestriton* 应为瘰螈属的亚属较为适宜^[5]。Lu 等基于部分线粒体 DNA 序列的分子系统学研究表明,瘰螈属是单系起源的,尾斑瘰螈是该属最基本的物种^[6]。Weisrock 等的分子系统学研究也支持尾斑瘰螈是这一单系起源组里的最基本物种,与其他瘰螈物种形成姊妹群^[7]。费梁等认为尾斑瘰螈作为瘰螈属的一个种组为宜,且认为尾斑瘰螈雷公山种群(地模标本)和江口种群个体间有明显的形态学差异^[1]。Dubois 等认为尾斑瘰螈应当作为瘰螈属的一个亚属 *Allomestriton*,瘰螈属的其他物种隶属 *Paramesotriton* 亚属^[8]。

遗传多样性是物种多样性和生态系统多样性的基础。任何物种,只有具备了一定的遗传多样性才能抵御自然界中的各种生存压力,否则,灭绝将是不可避免的^[9]。在了解物种遗传结构和遗传多样性现状的前提下,才能够制定出切实可行的保护策略。然而基于分子生物学方法对尾斑瘰螈各地理种群的遗传分化和遗传多样性的研究尚未见报道。

动物线粒体 DNA D-loop 区也称 D 环或者控制区,位于线粒体 DNA 的 tRNA^{Pro} 和 tRNA^{Phe} 基因之间^[10]。D-loop 区是非编码区,A + T 含量大于 C + G 含量,进化速度是整个 mtDNA 中最快的,比其他区域高出 5 ~ 10 倍^[11]。常常作为一种有效的分子标记,研究种内遗传结构、遗传多样性、瓶颈效应等^[12-13]。

本文基于尾斑瘰螈线粒体 DNA D-loop 区

的遗传变异,对尾斑瘰螈的种群遗传多样性进行分析,旨在揭示不同地理种群间亲缘关系以及遗传分化的情况,并为更好地保护我国这一特有而重要的物种提供必要的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料 本研究所用的尾斑瘰螈标本自 2008 年 4 月到 2009 年 7 月采于贵州省雷山县大塘、西江和方祥乡(地模标本),江口县梵净山自然保护区和重庆酉阳青华林场。雷山县大塘、西江和方祥乡属贵州雷公山自然保护区,位于贵州省东南部苗岭山地,主峰雷公坪海拔 1 850 m;梵净山自然保护区位于贵州江口、松桃和印江之间,处于云贵高原向湘西丘陵的过渡地区,是武陵山脉的主峰,最高海拔 2 572 m,重庆酉阳青华林场所处山脉亦属武陵山系(图 1)。为获湖南省江永、道县交界的都庞岭(东经 111°18' 北纬 25°27')的尾斑瘰螈标本,作者于 2008 年 7、8 月及 2009 年 7 月 3 次到达该地进行野外调查,可能是由于环境恶化的原因,未有收获。

本研究采用无损伤取样,即剪取尾斑瘰螈尾端 1 cm 作为样品,之后个体放生。得到的样品以 95% 的酒精浸泡,并保存于 -25℃ 冰箱。共收集到雷公山的 3 个种群(方祥、西江和大塘)及位于武陵山系的 2 个种群(贵州江口和重庆酉阳)的尾斑瘰螈标本共 42 份(表 1)。

1.2 DNA 的提取 采用蛋白酶 K、酚、氯仿法提取肌肉组织总 DNA:取少量保存于 95% 酒精中的肌肉组织,加入 200 μ l 裂解液 STE (5 mol/L NaCl, 1 mol/L Tris-HCl pH 8.0, 0.5 mol/L EDTA pH 8.0),迅速剪碎使之成浆状,加入 250 μ l STE、25 μ l 20% SDS、25 μ l 蛋白酶 K (10 mg/ml),于 50℃ 恒温摇床消化过夜。然后用饱和酚抽提两次,25:24:1 的饱和酚、三氯甲烷、异戊醇的混合液抽提一次,24:1 的三氯甲烷和异戊醇混合液抽提一次,异丙醇沉淀 DNA 4 ~ 5 h,最后用 75% 冰冻乙醇洗涤 DNA 并保存于 4℃ TE 中 (1 mol/L Tris-HCl pH 8.0, 0.5 mol/L EDTA pH 8.0)。

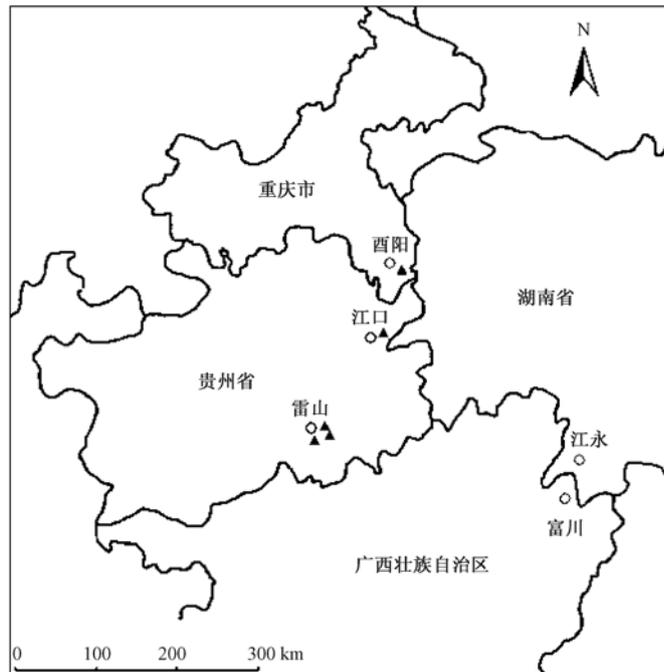


图 1 尾斑瘰螈的分布和标本采集地示意图

Fig. 1 The distributional range and sampling sites of *Paramesotriton caudopunctatus*

○ 为物种分布地; ▲ 为标本采集点。

○ Represents species distribution; ▲ Represents sampling sites.

表 1 尾斑瘰螈标本数和采集地资料

Table 1 Sample numbers and sampling sites of *Paramesotriton caudopunctatus*

种群 Population	个体数 Sample number	采集地 Collection sites	海拔 Altitude (m)	经纬度 Coordinate
雷公山 Leigongshan	方祥 Fangxiang	贵州省雷山县方祥乡	1 380	E 108°10'12.048" N 26°29'20.440"
	大塘 Datang	贵州省雷山县大塘乡	960	E 108°41'26.755" N 26°18'49.421"
	西江 Xijiang	贵州省雷山县西江	1 170	E 108°16'40.140" N 26°25'59.062"
武陵山 Wulingshan	江口 Jiangkou	贵州省江口县梵净山	1 200	E 108°36'46.439" N 27°51'10.945"
	酉阳 Youyang	重庆市酉阳清华林场	1 090	E 108°42'44.868" N 28°57'7.120"

1.3 PCR 扩增 扩增体积采用 25 μl 体系,其中含:模版 DNA 1 μl (0.2 ~ 0.5 g/L), 正、反引物各 1 μl (10 $\mu\text{mol/L}$), $2 \times \text{Taq PCR MasterMix}$ 12.5 μl (含 0.1 U *Taq* Polymerase, 0.5 mmol/L dNTP, 200 mmol/L Tris-HCl 100 mmol/L KCl 和 3 mmol/L MgCl_2)。所用引物为, DL11: 5'-GGC

ACC CAA GGC CAA AAT TCT-3'; DL12: 5'-CAA GGC CAG GAC CAA ACC TTT A-3'^[6]。

目标片段扩增在 PTC-200 Peltier Thermal Cycle DNA 扩增仪 (Bio-Rad Laboratories, Inc. USA) 上进行。热循环流程为: 95°C 预变性 5 min, 之后是 32 个热循环, 包括 94°C 变性 30 s,

50℃引物退火 1 min, 72℃延伸 1 min, 热循环结束后, 72℃总延伸 10 min。反应产物用 1.6% 琼脂糖凝胶电泳检测, 用 EB 染色, 并于凝胶成像系统紫外光下观察。所用药品和引物均来自上海生工生物技术工程公司。序列的纯化和测定工作由上海鼎安生物科技有限公司完成。

1.4 数据分析 所得序列经 NCBI 搜索, 分析其相似性^[14], 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。应用 Arlequin 3.1 软件中的 pairwise difference 模型统计核苷酸多样性 (P_i)、平均核苷酸差异数 (k)^[15], 并进行分子方差分析 (AMOVA), 估算群体间遗传分化指数 (F_{ST}), 用排列测验法 (Permutation test) 检验 F_{ST} 显著性 (重复次数为 1 000)。利用 DnaSP 4.0 软件计算各地理种群多态位点 (S)、单倍型多样性指数 (H_d) 和核苷酸歧异度 (D_{xy}) 等。通过 F_{ST} 估算种群间基因流 N_m , $N_m = (1/F_{ST} - 1)/2$ 。采用 MEGA 4.0 的 Kimura 双参数模型计算遗传距离。利用 DnaSP 4.0 软件中的 Fu and Li's D test、Tajima's D 和 F_s 进行中性进化的歧异度检验。

基于 MEGA 4.0 的 Kimura 双参数模型用 NJ 法构建系统进化树, 利用 PAUP * 4.0 软件中的最大简约法构建 MP 树, 对 NJ 树和 MP 树分别进行自引导检验获得系统分支的置信度, 重复次数为 1 000。构树时用尾斑瘰螈的近缘种香港瘰螈 (*P. hongkongensis*) 和德氏瘰螈 (*P. deloustali*) (GenBank 登录号: EU880327, NC006407) 作外群, 以获取系统树的根。同时使用软件 NETWORK 4.5.1.0, 对定义的单倍型进行网络进化 (median joining) 分析, 构建网络进化树。

2 结果

2.1 D-loop 区序列及变异 本研究获得尾斑瘰螈各地理种群线粒体 DNA D-loop 区全序列 42 条, 长度均为 690 bp, 通过与 NCBI 中尾斑瘰螈线粒体 DNA 全序列 (登录号: EU880326) 比

对, 获得的序列全部位于 D-loop 区 (15 598 ~ 16 287), 表明用于分析的序列确实为尾斑瘰螈线粒体 D-loop 区序列, 排除了实验中发生外源 DNA 污染的可能。序列中并未发现重复序列, A、T、G、C 的平均含量分别为 30.0%、33.5%、21.1%、15.3%。碱基转换颠换比 (Ts/Tv) 为 1.065, 转换和颠换相当, 表现出较低的转换偏歧 (bias)。

分析 D-loop 区 690 bp 序列后发现 30 个变异位点, 约占总分析位点的 4.40%, 3 个插入/缺失位点约占总分析位点的 0.44%。由 30 个变异位点定义出 13 个单倍型 (haplotype), 其中, 雷公山的方祥种群包括 3 个单倍型 (FX1 ~ FX3), 西江种群包括 3 个单倍型 (XJ1 ~ XJ3), 大塘种群有 1 个单倍型 (DT); 武陵山的江口种群包含 3 个单倍型 (JK1 ~ JK3), 酉阳种群包含 3 个单倍型 (YY1 ~ YY3) (表 2)。未发现共享单倍型的现象。

2.2 遗传多样性参数 尾斑瘰螈遗传多样性参数见表 3, 各群体 D-loop 区的多态位点都为 0 ~ 3 个; 核苷酸多态性 (P_i) 介于 0.000 0 到 0.002 5 之间; 平均核苷酸差异数 (k) 介于 0.000 0 到 1.714 3 之间; 单倍型多样性指数 (H_d) 介于 0.556 1 到 1.000 0 之间。

从 Tajima's D 和 Fu and Li's D test 值来看, 5 个种群相对于中性进化的歧异度并没有出现明显的偏离 ($P > 0.1$), 且方祥种群的 Fu's F_s 值为负值 (-0.239 0)。

2.3 种群遗传分化和基因流 雷公山的 3 个自然种群 (方祥、西江和大塘种群) 间的遗传分化指数 (F_{ST}) 在 0.571 4 ~ 0.777 8 之间, 武陵山的江口种群与酉阳种群之间的 F_{ST} 为 0.579 0。雷公山种群同武陵山种群的平均遗传分化指数为 0.905 6。根据遗传分化指数可以计算出雷公山 3 个自然种群 (方祥、西江和大塘种群) 间的基因流 (N_m) 为 0.142 7 ~ 0.375 0; 武陵山的江口种群同酉阳种群间的 N_m 为 0.363 6。雷公山种群同武陵山种群间平均 N_m 为 0.052 4 (表 4)。

2.4 种群间 Kimura 2-parameter 距离 雷公

表 2 13 个单倍型及其在尾斑瘰螈种群中的分布

Table 2 Thirteen haplotypes defined and their distribution among *Paramesotriton caudopunctatus* populations

地理种群 Geographic population	单倍型 名称 Haplotype code	变异位点及序列 Variable sites and Haplotype sequence													样本数 Number of samples	登录号 GenBank accession number	
		2	20	94	96	166	199	219	220	226	304	308	378	380			399
雷公山 Leigongshan	方祥 Fangxiang	FX1	ACATTTTATTTTCATACCGCCGCGCATGCAATC													2	GZNUFX1
		FX2 A.													6	GZNUFX2
		FX3 G.....													1	GZNUFX3
	西江 Xijiang	XJ1 C..... A..... A.													3	GZNUXJ1
		XJ2 C..... G. A. G..... A.													3	GZNUXJ2
		XJ3 C..... A..... A..... A.													4	GZNUXJ3
	大塘 Datang	DT A..... A..... A.													7	GZNUDT
武陵山 Wulingshan	江口 Jiangkou	JK1	. -CC. GCT. . C. GAT. TAT. . T. -AAGGA.													2	GZNUJK1
		JK2	. -CC. GCT. . C. GAT. . ATA. T. . AAGGA.													1	GZNUJK2
		JK3	. -CC. GCT. . C. GAT. TAT. . T. -AAGG. .													5	GZNUJK3
	酉阳 Youyang	YY1	T. CC. GCT-A. . GAT. TAT. . TG-AAGG. G													2	GZNUYY1
		YY2	. . CC. GCT. . . . GAT. TAT. . TG-AAGG. .													2	GZNUYY2
		YY3	. . CC. GCT. . . . GAT. TAT. . TG-AAGG. G													4	GZNUYY3

数字表示单倍型变异位点; “.”表示与第一个单倍型有相同的碱基组成; “-”表示碱基缺失。

Numbers showing the variation positions of haplotype; “.” represents identity with haplotype Hap-1; “-” represents base deletion.

表 3 尾斑瘰螈种群 D-loop 区遗传多样性参数

Table 3 Genetic diversity parameters of mtDNA D-loop of *Paramesotriton caudopunctatus* populations

	雷公山 Leigongshan			武陵山 Wulingshan	
	方祥 Fangxiang	西江 Xijiang	大塘 Datang	江口 Jiangkou	酉阳 Youyang
多态位点(S) Polymorphic sites	2	3	0	3	3
单倍型多样性 Haplotype diversity (H_d)	0.556 1	0.733 2	1.000 0	0.607 3	0.714 2
核苷酸多态性(P_i) Nucleotide diversity	0.001 1	0.002 1	0.000 0	0.001 9	0.002 5
平均核苷酸差异数(k) Average number of pairwise differences	0.722 3	1.467 4	0.000 0	1.286 3	1.714 3
Fu and Li's D test	-0.221 0 ^a	1.154 2 ^a	0.000 0 ^a	-0.632 3 ^a	1.233 8 ^a
Tajima's D test	-0.063 8 ^a	1.378 2 ^a	0.000 0 ^a	-0.431 4 ^a	0.457 7 ^a
Fu's Fs	-0.239 0	1.260 3	0.000 0	0.268 3	0.671 4

a: $P > 0.10$, 无显著差异。a: $P > 0.10$, Not significant.

山种群 3 个自然种群(方祥、西江和大塘种群)间的 Kimura 2-parameter 距离 0.003 4 ~ 0.010 2, 武陵山的江口种群和酉阳种群的 Kimura 2-parameter 距离为 0.015 2。雷公山 3 个自然种群与武陵山的 2 个种群的平均 Kimura 2-parameter 距离为 0.032 3 (表 5)。

2.5 种群间核苷酸歧义度 在雷公山种群中, 方祥种群与西江种群、大塘种群的核苷酸歧义度(D_{xy})分别为 0.005 0、0.003 5, 西江种群与大塘种群的 D_{xy} 为 0.003 2; 武陵山江口种群同酉阳种群的 D_{xy} 为 0.014 4。雷公山 3 个自然种群与武陵山 2 个种群的平均 D_{xy} 为 0.031 72。

表 4 尾斑瘰螈种群间 D-loop 区遗传分化指数 (F_{ST}) 和基因流 (N_m)
 Table 4 Fixaion index (F_{ST}) and migration rates (N_m) among mtDNA D-loops of
Paramesotriton caudopunctatus populations

		雷公山 Leigongshan			武陵山 Wulingshan	
		方祥 Fangxiang	西江 Xijiang	大塘 Datang	江口 Jiangkou	酉阳 Youyang
雷公山 Leigongshan	方祥 Fangxiang		0.357 2	0.142 9	0.059 2	0.056 6
	西江 Xijiang	0.583 3		0.375 0	0.066 0	0.060 3
	大塘 Datang	0.777 8	0.571 4		0.037 7	0.034 5
武陵山 Wulingshan	江口 Jiangkou	0.894 1	0.883 3	0.929 8		0.363 6
	酉阳 Youyang	0.898 3	0.892 3	0.935 5	0.579 0	

对角线下方为遗传分化指数 (F_{ST}), 对角线上方为群体间的基因流 (N_m)。

Below the diagonal: F_{ST} values based on haplotypic frequencies; Above the diagonal: migration rates (N_m).

表 5 尾斑瘰螈种群间 D-loop 区 Kimura 2-parameter 距离

Table 5 Kimura 2-parameter distance among mtDNA D-loops of *Paramesotriton caudopunctatus* populations

		雷公山 Leigongshan			武陵山 Wulingshan	
		方祥 Fangxiang	西江 Xijiang	大塘 Datang	江口 Jiangkou	酉阳 Youyang
雷公山 Leigongshan	方祥 Fangxiang					
	西江 Xijiang	0.010 2				
	大塘 Datang	0.008 8	0.003 4			
武陵山 Wulingshan	江口 Jiangkou	0.025 9	0.027 5	0.026 0		
	酉阳 Youyang	0.038 1	0.037 9	0.038 0	0.015 2	

2.6 系统进化树 NJ 和 MP 树中(图 2)均可见 13 个单倍型按照各自的地理分布聚合:雷公山方祥种群(FX1 ~ FX3)与西江种群(XJ1 ~ XJ3)、大塘种群(DT)聚为一支,武陵山江口种群(JK1 ~ JK3)分支和酉阳种群(YY1 ~ YY3)分支构成另一支,然后再与雷公山种群聚合。

中介网络进化分析显示(图 3),尾斑瘰螈 13 个单倍型亦各自按地理分布聚合,雷公山的方祥种群的单倍型 FX2 处于尾斑瘰螈种群分化的中心,网络进化树基本上同 NJ 树和 MP 树相互支持。

3 讨论

遗传多样性对物种的生存具有重要的意义。研究表明,遗传多样性的丧失对物种生存带来直接的不利影响,遗传多样性的丧失可以使物种更加容易灭绝。遗传多样性也是评价一

个物种进化潜力高低,抵制自然界各种生存压力的能力强弱的重要遗传学指标,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^[16]。本研究用尾斑瘰螈采于苗岭山系的雷公山、武陵山系的梵净山自然保护区和酉阳青华林场。两大山系间河流交错(如清水江、舞阳河等),苗岭山系更是珠江水系与长江水系的分水岭,山地坡度较陡,自然切割明显,对于两栖类的迁徙形成地理上和生态上的屏障,因而两山系的尾斑瘰螈地理种群可能处于相互隔离或半隔离的状态。

所获尾斑瘰螈各种群共 42 条 690 bp 的 D-loop 区序列共包含 30 个变异位点。3 个插入/缺失位点占全部序列长度的 0.44%,说明序列的突变并非发生在近期^[17]。

尾斑瘰螈各种群的单倍型多样性 (H_d) 为 0.556 1 ~ 1.000 0,核苷酸多样性 (P_i) 0.000 0

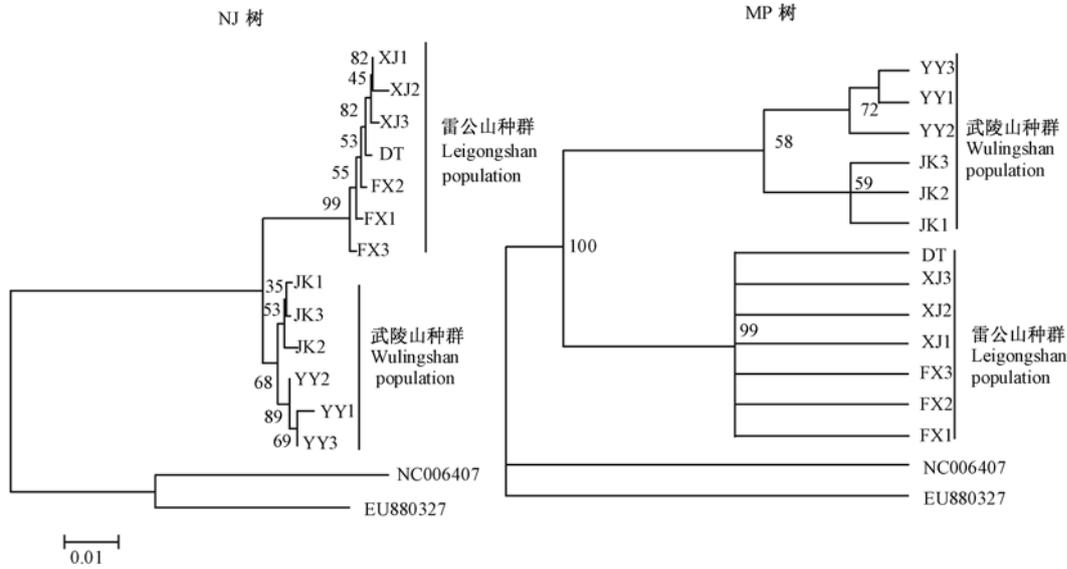


图 2 13 个尾斑瘰螈 D-loop 区单倍型 NJ 法和 MP 法系统发育树

Fig. 2 The NJ and ME phylogenetic trees of *Paramesotriton caudopunctatus*'s 13 haplotypes based on mtDNA D-loop

接点处数值表示 1 000 次重复抽样检验值。标尺表示位点碱基替换率。

FX: 方祥群体; DT: 大塘群体; XJ: 西江群体; JK: 江口群体; YY: 酉阳群体。

The values in nodes represent local bootstrap values from 1 000 replicates. The scale means substitutions/site.

FX: Fangxiang population; DT: Datang population; XJ: Xijiang population; JK: Jiangkou population; YY: Youyang population.

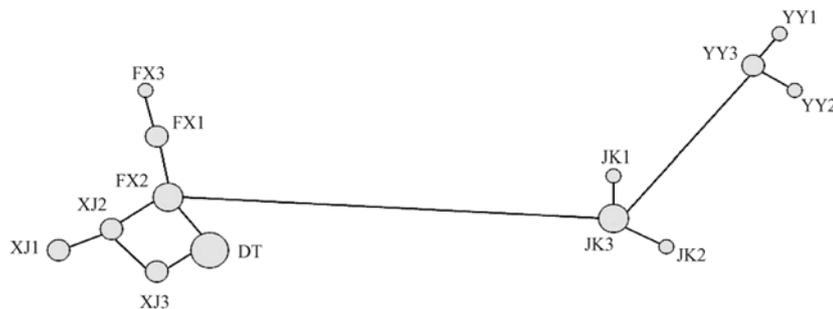


图 3 尾斑瘰螈单倍型的中介网络进化分析

Fig. 3 Median joining Network analysis based on mtDNA haplotypes of *Paramesotriton caudopunctatus*

单倍型之间的连线长度约表示变异次数; 圆圈大小约表示该单元型出现的次数。

The length of lines roughly represents mutational steps; The size of circles roughly represents the number of individuals.

~0.002 5, 即尾斑瘰螈种群有相对较多的单倍型数目和较低的核苷酸多样性。这种较高的单倍型数和较低核苷酸多样性值表明尾斑瘰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倍型的多态性, 但却还未能积累核苷酸序列的多样化^[19]。这种很低的核苷酸多样性也可能是由于生境的破碎化以及

多种历史原因的综合结果^[20]。

于雷公山所获的方祥、西江和大塘 3 个自然种群之间的遗传分化指数 (F_{ST}) 为 0.571 4 ~ 0.777 8, 武陵山的江口种群与酉阳种群之间的 F_{ST} 为 0.579 0; 而雷公山 3 个自然种群与武陵山 2 种群的平均 F_{ST} 为 0.905 6 (表 4)。雷公山种群、武陵山种群内部的 F_{ST} 明显小于雷

公山种群同武陵山种群之间的平均 F_{ST} 。由此可见武陵山种群(酉阳、江口)与雷公山种群(方祥、西江和大塘)之间有了明显的分化。

当基因流 $N_m < 1$ 时,种群间可能由于遗传漂变而产生分化;当 $N_m > 1$ 时,群体间存在较为丰富的基因流。雷公山的方祥、西江和大塘种群之间的 N_m 为 0.142 9 ~ 0.375 0,武陵山的江口种群同酉阳种群间 N_m 为 0.363 6;而雷公山的 3 种群与武陵山的 2 种群间平均 N_m 为 0.052 4 (表 4),由此可见雷公山种群、武陵山种群内部 N_m 较雷公山种群同武陵山种群间 N_m 丰富。这些数据亦说明,武陵山 2 种群与雷公山 3 种群之间出现了明显的遗传分化。此外,武陵山 2 种群与雷公山 3 种群间的平均 Kimura 2-parameter 遗传距离值为 0.032 3,该值远大于雷公山的方祥、西江和大塘种群间的 0.003 4 ~ 0.010 2,以及江口种群与酉阳种群的 0.015 2 (表 5);再者,雷公山种群内部 3 种群间的核苷酸歧义度 (D_{xy}) 为 0.003 2 ~ 0.005 0,武陵山江口种群同酉阳种群的 D_{xy} 为 0.014 4,远小于雷公山种群与武陵山种群的平均 D_{xy} 0.031 7,均表明雷公山种群、武陵山种群内部遗传分化不明显,而武陵山种群与雷公山种群之间出现了明显的遗传分化。实际上,方祥、西江和大塘种群均分布于贵州雷山县雷公山,隶属于苗岭山脉,而江口种群分布于贵州梵净山地区,与重庆酉阳种群所在山脉同属于武陵山系,两山系之间有大河(如清水江、舞阳河等)隔离,在一定程度上对种群间的遗传分化起到了重要影响。

系统发育分析表明,13 个单倍型总体上显示为 2 个大的地理支群,其中属雷公山的 3 个种群的单倍型聚合成一支,武陵山的江口、酉阳种群的单倍型各自聚类成独立的分支,然后这两支再聚类构成另一支。这可能与自然隔离引起的种群分化有关,与上述遗传多样性分析的推论一致。

Tajima's D 和 Fu and Li's D 值检测结果表明,这 5 个尾斑瘰螈种群相对于中性进化的歧异度并没有明显的偏离 ($P > 0.1$),根据蝶

螈科真螈属 (*Salamandra*) D-loop 区每百万年 0.84% 的进化速率^[21] 和单倍型间平均碱基差异 2.152 7% 计算,单倍型间的分化时间为距今约 270 万年,约处于第四纪冰期的早期^[22]。

此外,雷公山的方祥种群的 F_u 's F_s 值为负值(-0.239 0),表明随着气候和环境的不断改变,该种群经历了一个较强的种群增长与扩散^[23],进而逐渐形成一些小种群。中介网络进化分析的结果表明,方祥群体的单倍型 FX2 可能是最原始的,可能是尾斑瘰螈种群分化的中心,并且武陵山的江口种群和酉阳种群的分化最终都可追溯到这个单倍型。

尾斑瘰螈是我国特有的有尾两栖动物。本研究表明,武陵山的 2 个种群(江口和酉阳)与属雷公山的 3 个种群(方祥、西江和大塘)之间出现了明显的差异,种群分化明显。实际上,雷公山种群个体与江口和酉阳种群个体在形态学方面存在明显的差异:雷公山标本个体均较江口标本小,雷公山标本的背脊棱均高于江口标本;雷公山标本尾相对长度均为体长的 46% 左右,而江口和酉阳标本尾相对长度为体长的 49% 左右^[1,24]。

基于以上原因,应将雷公山种群、武陵山种群分别作为 2 个不同单元进行保护,并进行更深入的研究。

参 考 文 献

- [1] 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: 294 - 313.
- [2] 国家林业局令(2003 年第 7 号). <http://www.forestry.gov.cn>
- [3] Sparreboom M. On the sexual behaviour of *Paramesotriton caudopunctatus* (Liu and Hu) (Amphibia, Caudata, Salamandridae). *Amphibia Reptilia*, 1983, 4: 25 - 33.
- [4] Freytag G E. Zur systemtischen stellung von *Trituride caudopunctatus* (Liu and Hu, 1973) morphometischen and rontgenanatomische befunde (Amphibia, Caudata: Salamandridae). *Zoologische Abhandlungen Staatliches Museum Für Tierkunde in Dresde*, 1983, 39(2): 39 - 49.
- [5] 庞家庆,江耀明,胡其雄. 中国瘰螈属 *Paramesotriton* (Caudata, Salamandridae) 的分类研究 // 江耀明. 两栖爬行动物学论文集. 成都:四川科学技术出版社,1992: 89 - 100.
- [6] Lu S Q, Yuan Z G, Pang J F, et al. Molecular Phylogeny

- of the Genus *Paramesotriton* (Caudata; Salamandridae). *Biochemical Genetics*, 2004, 42(5/6): 139 - 148.
- [7] 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(2): 368 - 383.
- [8] Dubois A, Raffaelli J. A new ergotaxonomy of the family Salamandridae Goldfuss, 1820 (Amphibia, Urodela). *Alytes*, 2009, 26(1/4): 1 - 85.
- [9] Frankham R, Ballou J D, Briscoe D A. *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge: Cambridge University Press, 2002: 78 - 104.
- [10] Randi E, Lucchini V. Organization and evolution of the mitochondrial DNA control region in the avian Alectoris. *Journal of Molecular Evolution*, 1998, 47(4): 449 - 462.
- [11] Mackay S L, Olivo P D, Laipis P J, et al. Template-directed arrest of mammalian mitochondrial DNA synthesis. *Molecular and Cell Biology*, 1986, 6(4): 1261 - 1267.
- [12] Rosel P E, Block B A. Mitochondrial control region variability and global population structure in the swordfish *Xiphias gladius*. *Marine Biology*, 1996, 125(1): 11 - 22.
- [13] David D D, Turner B J. Evolutionary genetics of Death Valley pupfish populations: Mitochondrial DNA sequence variation and population structure. *Molecular Ecology*, 1998, 7(3): 279 - 288.
- [14] Zhang J H, Madden T L. Power BLAST: a new network BLAST application for interactive or automated sequence analysis and annotation. *Genome Research*, 1997, 7: 649 - 656.
- [15] 袁娟,张其中,李飞,等.铜鱼线粒体控制区序列的序列变异和遗传多样性. *水生生物学报*, 2010, 34(1): 9 - 19.
- [16] 鲍毅新,程宏毅,周襄武,等.黑麂三个种群的遗传多样性. *生态学报*, 2008, 28(8): 4030 - 4036.
- [17] Quinn T W, Wilson A C. Sequence evolution in and around the mitochondrial control region in birds. *Journal of Molecular Evolution*, 1993, 37(4): 417 - 425.
- [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] 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.
- [21] 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.
- [22] 景才瑞,刘会平.论中国第四季冰期和间冰期. *成都理工大学学报*, 1999, 26(1): 97 - 100.
- [23] 李明,饶刚,魏辅文,等.小熊猫种群遗传结构和地理分化. *动物学报*, 2002, 48(4): 480 - 486.
- [24] 谢锋,何学福,温涛.重庆地区有尾两栖动物两新纪录. *四川动物*, 2004, 23(3): 215 - 216.

(上接第 84 页)

②图表:力求精选,反应同一数据的图与表不能重复。其序号一律采用阿拉伯数字编码,在文中引用处注明。线条图应用计算机绘制;照片图要求反差适中、层次清晰。显微及电镜照片,应注明长度标尺和放大倍数。

参考文献 应列出与本文直接有关的中外文主要文献。本刊文献的著录格式采用顺序编码制,即以文献在文中出现的先后顺序连续编码,加方括号标注在文中引用处,文后文献表的文献要与文中一致,并按文中的顺序排列,多名作者在列出前三名作者后加“等”。具体格式要求为:

①期刊:作者.题名.刊名,出版年,卷(期)号;起止页码.示例:

[1] 郑光美.黄腹角雉. *动物学杂志*, 1987, 22(5): 40 - 43.

[2] Wu P, Zhou K Y. General condition of systematics study on Testudines. *Chinese Journal of Zoology*, 1998, 33(6): 38 - 45.

②专著:作者.书名.版本(第一版不标注).出版地:出版者,出版年;起止页码.示例:

[3] 孙儒泳. *动物生态学原理*. 2 版.北京:北京师范大学出版社, 1992: 329 - 330.

[4] Jiang Z G. *Conservation Biology*. Hangzhou: Zhejiang Science and Technology Press, 1997: 160 - 164.

③论文集:作者.题名//编者.论文集名.出版地:出版者,出版年;起止页码.示例:

[5] 陈大元. *动物显微受精与克隆研究*//中国动物学会. *中国动物科学研究*. 北京:中国林业出版社, 1999: 59 - 64.

[6] Yang T. On the leeches from Wuling Mountains area in south China//Song D X. *Invertebrates of Wuling Mountains Area, Southwestern China*. Beijing: Science Press, 1997: 395 - 399.