

研究简报

# 中国大鲵五地理种群 Cyt b 基因全序列及其遗传关系分析

陶峰勇<sup>1,2</sup> 王小明<sup>1</sup> 郑合勋<sup>1</sup>

(1. 华东师范大学生命科学学院, 上海 200062; 2. 上海水产大学生命科学与技术学院, 上海 200090)

## ANALYSIS OF COMPLETE CYTOCHROME B SEQUENCES AND GENETIC RELATIONSHIP AMONG CHINESE GIANT SALAMANDERS (*ANDRIAS DAVIDIANUS*) FROM DIFFERENT AREAS

TAO Feng-Yong<sup>1,2</sup>, WANG Xiao-Ming<sup>1</sup> and ZHENG He-Xun<sup>1</sup>

(1. School of Life Sciences, East China Normal University, Shanghai 200062;

2. College of Aquatic Science and Technology, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090)

关键词: 大鲵; 细胞色素 b; 地理种群; 遗传差异

**Key words:** Chinese giant salamander; Cyt b; Geographical population; Genetic difference

中图分类号: Q346 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2006)05-0625-04

中国大鲵(*Andrias davidianus*)为特有的珍稀有尾两栖动物, 是世界上体形最大的两栖类物种<sup>[1]</sup>。该物种在中国分布范围非常广, 遍及长江、黄河和珠江三大水系, 涉及 17 个省市。大鲵栖息在不同纬度、不同气候带和不同的水系之中, 并且由于多方面的原因, 使该物种的栖息环境呈现出严重的片断化<sup>[2]</sup>; 同时, 大鲵对水环境的依赖程度很大, 其扩散能力较差, 这样大鲵很可能出现不同地理种群的遗传分化和形态变异。

在两栖类有尾目中有许多动物存在着由于地理分化引起的遗传差异。mtDNA 已被广泛地用于解决种群差异与生物地理的关系, 而 Cyt b 基因在线粒体基因组中进化速度适中, 较短的一个片段就能包含从种下水平到属水平的系统发育信息; Kenneth 等的研究也表明了 Cyt b 基因可以作为研究亚种和种群的生物地理分布的标记基因。国内有学者对中国大鲵进行了形态学、解剖学等方面深入研究, 并与日本大鲵进行了比较, 确认了中国大鲵为有效种, 但 Murphy 等用同工酶、ATPase6 基因片段和长为 306bp 的 Cyt b 基因片段对中国的 6 个大鲵地理种群遗传差异的研究只表明了安徽种群具有独特的遗传特征<sup>[3]</sup>。同时, Graziano 等认为, 较短的序

列对于系统树基本分支来说信号较弱, 需要较长的序列, 即系统进化推论的稳定性和可靠性随序列数据的增加而加强<sup>[4]</sup>。鉴于此, 为了进一步探讨大鲵各地方种群的地理分化对遗传差异的影响, 对来自 5 个不同地理区域的 13 个大鲵野生个体的线粒体 DNA 细胞色素 b 基因全序列进行比较分析研究。

### 1 材料和方法

**1.1 样品来源** 所研究的 13 个大鲵样品(肌肉组织)分别来源于广西龙胜(4 个)、河南卢氏(3 个)、陕西汉中(3 个)、湖南壶瓶山(2 个)和四川绵阳(1 个)。这些样品取自 2002—2004 年间, 并用 75% 无水乙醇保存于 -20℃ 的冰箱内。各样品的编号见表 1 注释。

**1.2 总 DNA 提取** 参照 Sambrook 的方法进行提取<sup>[5]</sup>, 再用无水乙醇(-20℃)沉淀和 70% 的乙醇洗涤, 离心甩干, 最后溶于 40μL 的 TE 中。

**1.3 PCR 扩增 mtDNA 细胞色素 b 基因全序列** 扩增引物参考 Morphy 等报道<sup>[3]</sup>的扩增引物(L8552 和 H8956, L14841 和 H15149)以及 Zhang 等的测序结果<sup>[6]</sup>, 进行改进和进一步设

收稿日期: 2005-03-09; 修订日期: 2006-03-20

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 30370244); 教育部跨世纪优秀人才培养计划; 国家“十五”“211 工程”重点学科建设生态学科基金资助

作者简介: 陶峰勇(1980—), 男, 硕士研究生, 研究方向: 分子生态学。本研究得到了浙江大学濒危野生动植物保护遗传与繁殖教育部重点实验室同学的大力支持; 华东师范大学生态学实验室的丁由中老师、曹丽荣博士、戴捷硕士等同学的热情帮助; 上海崇明东滩自然保护区章克家, 广西龙胜的吴志浩, 河南卢氏的陈平和翟立为本文采集了标本, 在此谨致衷心感谢

通讯作者: 王小明, E-mail: xmwang@ecnu.edu.cn

计,成为与大鲵细胞色素 b 全序列完全匹配的引物序列为:

CBP: 5'-AAAGCTGCAAAATATGGTGAACGA-3'

CBL: 5'-GCCGTGAGCCGCAGGAA-3'

PCR 反应在 PTC-200 Peltier Thermal cycler (MJ Research, Inc. USA) 上进行。反应总体积为 50 $\mu$ L。反应条件为: 95℃ 预变性 10min, 94℃ 变性 1min, 56℃ 复性 1min, 72℃ 延伸 1min, 并进行 35 个循环; 72℃ 延伸 10min。利用未加模板 DNA 的反应液作为空白对照, 以检查是否有污染存在。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 于 -20℃ 保存。

**1.4 PCR 产物纯化和测序** 扩增得到的 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳, 所需带切下后用宝生物工程(大连)有限公司(Takara)生产的 DNA 凝胶回收试剂盒(TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit Ver. 2.0)纯化回收。全部序列均由上海晶泰生物技术公司用 Li-cor 4300 基因分析仪进行测序。

**1.5 DNA 序列数据的处理** 采用 CLUSTALW 软件将测序结果进行对位排序, 用分子进化遗传分析软件 MEGA2.0 软件计算不同序列间的碱基替代数、变异位点、简约信息位点数、颠换百分比、转换/颠换比率和 Kimura 两参数(2 parameter)距离; 用 DNASTAR 软件计算两两序列的遗传相似度和序

列差异百分比。通过 MEGA2.0 软件构建 NJ 树和采用 PAUP4.01 软件构建 MP 树; 在重建系统发生树时, 去除两两对位序列中的缺失, 并以卢氏小默螈(*Mertensiella luschanii*)和新疆北鲵(*Ranodon sibiricus*)作为外群进行分析, 同时应用自举法(Bootstrap)评估系统树。

## 2 结果

### 2.1 细胞色素 b 基因序列及其变异

测定了来自 5 个地区的 13 个大鲵标本, 结果 cyt b 基因的长为 1140bp; 经序列核对及氨基酸转换, 没有缺失或插入。同时, 在所有序列中共发现 11 个不同的单倍型(表 1)。

在这 13 个大鲵序列中, 共有 44 个位点呈现变异, 其中 23 个简约信息位点。在所有的 Cyt b 序列中, 碱基组成的百分比中显示了 G 的相对缺乏, A+T 的平均含量为 60.2%, 而 C+G 的平均含量为 39.8% (表 1)。核苷酸碱基的变异也存在很大的差异, 其中 T→C 的转换比 A→G 转换发生的多, 颠换中只有 A 与 T 之间的颠换发生, 没有 A 与 C、C 与 G 和 G 与 T 之间的颠换。核苷酸的替换主要以转换为主(转换/颠换数为 13/2), 转换多于颠换, 表现出高的转换偏倚(Bias)。

表 1 大鲵不同单倍型的碱基组成频率(%)

Tab. 1 Frequencies of base composition in different haplotypes of Chinese giant salamander

	T	C	A	G	T-1	G-1	A-1	G-1	T-2	G-2	A-2	G-2	T-3	G-3	A-3	G-3
GX1	32.2	24.9	27.9	15.0	25.7	25.5	26.8	22.0	40.8	24.2	20.3	14.7	30.1	25.1	36.7	8.2
GX2	32.4	24.8	27.8	15.0	26.0	25.2	26.8	22.0	41.3	23.9	20.0	14.7	29.8	25.3	36.7	8.2
GX3	32.4	24.8	27.9	14.9	26.0	25.2	26.8	22.0	41.6	23.7	20.3	14.5	29.6	25.4	36.8	8.2
GX4	32.4	24.8	28.0	14.8	26.0	25.2	26.8	22.0	41.3	23.9	20.5	14.2	29.8	25.3	36.7	8.2
SC	32.0	24.9	28.2	14.9	26.0	25.2	26.5	22.3	41.3	23.9	20.3	14.5	28.8	25.6	37.7	7.9
HUN1	32.4	24.8	27.8	15.0	26.0	25.2	26.5	22.3	41.3	23.9	20.3	14.5	29.8	25.3	36.7	8.2
HUN2/SX2	32.4	24.8	27.9	14.9	26.0	25.2	26.8	22.0	41.3	23.9	20.3	14.5	29.8	25.3	36.7	8.2
SX1	32.5	24.7	27.9	14.9	26.0	25.2	26.8	22.0	41.3	23.9	20.3	14.5	30.1	25.1	36.7	8.2
SX3	32.3	24.9	27.8	15.0	25.7	25.5	26.8	22.0	41.3	23.9	20.0	14.7	29.8	25.3	36.7	8.2
HEN1	32.0	24.9	28.1	15.0	26.0	25.2	26.5	22.3	41.3	23.9	20.0	14.7	28.8	25.6	37.7	7.9
HEN2/HEN3	31.8	25.1	28.2	14.8	25.7	25.5	26.5	22.3	41.3	23.9	20.3	14.5	28.5	25.9	38.0	7.7

注: 细胞色素 b 碱基的组成频率, 数字 1、2、3 分别表示密码子第一、二、三位。GX1、GX2、GX3、GX4 分别代表广西的 4 个大鲵标本, HEN1、HEN2、HEN3 分别表示河南的 3 个大鲵标本, HUN1、HUN2 分别表示湖南的 2 个大鲵标本, SC 表示四川的大鲵标本, SX1、SX2、SX3 分别表示陕西的 3 个大鲵标本。( Frequencies are given by codon position for cytochrome b. No 1, 2, 3 denote the 1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> codon positions. GX1, GX2, GX3, GX4 denote four Chinese giant salamander samples from Guangxi Province, HEN1, HEN2, HEN3 denote three Chinese giant salamander samples from Henan Province, HUN1, HUN2 denote two Chinese giant salamander samples from Hunan Province, SC denotes a Chinese giant salamander sample from Sichuan Province, SX1, SX2, SX3 denote three Chinese giant salamander samples from Shanxi Province.)

在 Kimura 双参数距离中, 所有 11 个单倍型间的数值在 0.0009—0.0242, 平均距离是 0.0120。在序列差异百分比表中, 所有单倍型间的数值在 0.1%—2.5% (平均为 1.2%)。(表 2)

### 2.2 分子系统树的构建

以新疆北鲵和卢氏小默螈作为外群构建 NJ 树(图 1:

A) 和 MP 树(图 1: B)。所有系统树支上数值为 1000 次自举(Bootstrap)检测得到的对该支的支持百分数。从图中可以看出这两种不同的分子系统树具有基本相同的拓扑结构; 拓扑结构分为 2 个大分支, 其中河南的 3 个个体和四川个体聚在一起为一分支; 而广西、湖南及陕西 9 个个体聚为另一分支。

表 2 大鲵 cyt b 全基因序列不同单倍型的双参数距离(对角线下)和序列差异百分比(对角线上)  
 Tab. 2 Kimura 2-parameter distance (below diagonal) and percent difference (above diagonal) for different  
 haplotypes on cytochrome b nucleotide sequences of Chinese giant salamander

	GX1	GX2	GX3	SC	GX4	HUN2/SX2	HEN1	HEN2/HEN3	HUN1	SX1	SX3
GX1		0.006	0.004	0.024	0.006	0.004	0.025	0.025	0.004	0.004	0.005
GX2	0.0062		0.004	0.022	0.005	0.003	0.023	0.023	0.004	0.004	0.004
GX3	0.0044	0.0035		0.021	0.004	0.001	0.022	0.022	0.002	0.002	0.003
SC	0.0242	0.0224	0.0215		0.023	0.021	0.001	0.010	0.021	0.021	0.022
GX4	0.0062	0.0053	0.0035	0.0233		0.003	0.024	0.024	0.004	0.004	0.004
HUN2/SX2	0.0035	0.0026	0.0009	0.0206	0.0026		0.021	0.021	0.001	0.001	0.002
HEN1	0.0251	0.0233	0.0224	0.0009	0.0242	0.0215		0.011	0.022	0.022	0.023
HEN2/HEN3	0.0251	0.0233	0.0224	0.0098	0.0242	0.0215	0.0106		0.022	0.022	0.023
HUN1	0.0044	0.0035	0.0018	0.0215	0.0035	0.0009	0.0224	0.0224		0.020	0.003
SX1	0.0044	0.0035	0.0018	0.0215	0.0035	0.0009	0.0224	0.0224	0.0018		0.003
SX3	0.0053	0.0044	0.0026	0.0224	0.0044	0.0018	0.0233	0.0233	0.0026	0.0026	

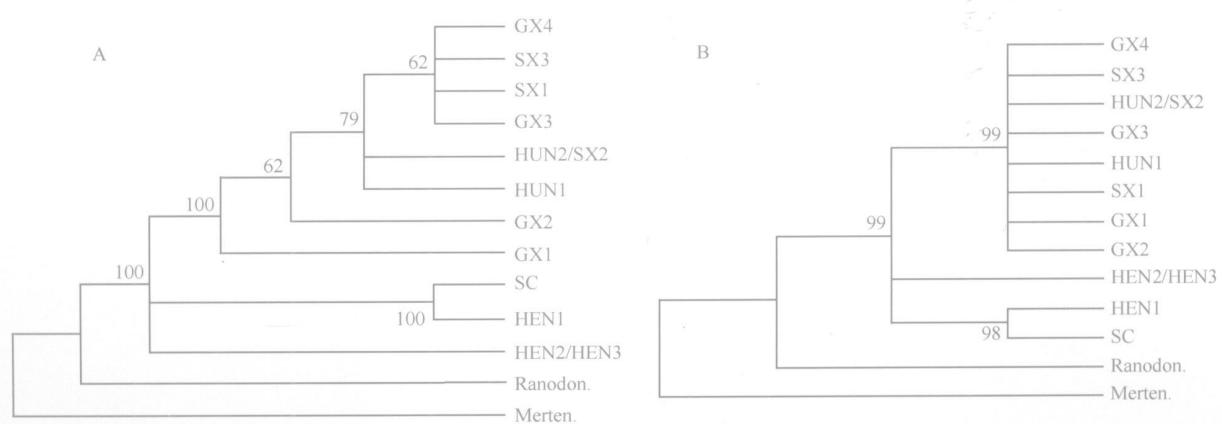


图1 基于 Cyt b 基因全序列构建的分子系统树

Fig. 1 Molecular phylogenetic trees based on cytochrome b sequences data with Bootstrap Test (1000 replications)

注: 图中数字为自举置信水平(BCL)值, Ranodon. 为新疆北鲵, Merten. 为卢氏小默螈。(The values of Bootstrap confidence level (BCL) of the nodes are indicated above the branch. Ranodon. is *Ranodon sibiricus*, and Merten. is *Mertensella lusshani*.)

### 3 讨论

5个大鲵地理种群之间的序列差异百分比在0.1%到2.5%之间(表2),是典型的以水生为主的两栖动物<sup>[7]</sup>。在两栖动物的mtDNA碱基替换中存在转换偏倚,随着进化时间的增加,颠换的积累,转换偏倚会下降;同时,一般认为转换颠换的比值小于2.0时,则此基因序列的突变已经达到饱和状态,受进化噪音的影响可能性较大。对大鲵地理种群的研究(表1)也说明了分歧时间越长、亲缘关系越远的分类单元之间,核苷酸发生颠换的频率越高,即亲缘关系较近的物种之间总是有更高的转换差异比例;同时,大鲵地方种群之间的偏倚可能会随着进化时间的增加和空间隔离的加剧而下降,而它们之间的突变因受到多重替换和饱和效应的影响而达到饱和。

Kimball认为只有当置信水平值(BCL)高于70%的分支才可信<sup>[8]</sup>。从构建的系统树(图1)上充分反映了广西地理种群与河南地理种群之间的遗传距离最远,而湖南、陕西和广西地理种群之间,河南与四川地理种群之间的遗传距离适中。所以考虑到大鲵在中国的分布现状和各地理种群的分布情况,将这5个地理种群分为3个水系:珠江流域(广西种群)、长江流域(湖南、陕西和四川种群)和黄河流域(河南种群)。故大鲵的遗传分化呈现出地理区域上的连续性;即黄河流域和长江流域的地理种群之间、珠江流域和长江流域的地理种群之间存在较小的遗传差异,黄河流域与珠江流域的地理种群之间存在着最大的遗传分化,其中长江流域种群充当了黄河流域种群与珠江流域种群的桥梁作用,与这3条河流的地理分布一致。而Murphy等对cyt b基因片段的研究结果并没有确定出这3条河流之间地理种群的亲缘关系。

Barber 等认为地理障碍与气候特征的差异在种系地理学结构的形成过程中可能起到了非常重要的作用<sup>[9]</sup>。从气候条件上看,广西龙胜属亚热带季风气候;河南卢氏县属暖温带大陆性气候。从地理分布上看,广西龙胜地处南部地区的珠江流域,河南卢氏县位于西北部的黄河南岸。两地的气候特征变化和地理隔离非常明显,珠江流域的广西地理种群和黄河流域的河南地理种群之间存在较大的遗传分化。而其他地理种群之间没有如此明显的气候变化和地理隔离(图1),再加洪水的冲击,使本身主要生活在清澈、较凉的较固定山溪中,迁徙能力较弱的大鲵进入同一地域中发生一定的基因交流。同时,随着经济、交通的发展和偷猎走私的日益猖獗,使大鲵有机会进入其他分布区,也进一步导致了各个地理种群遗传结构的变化。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Zhao E M. China red data book of endangered animals: amphibian and reptilia[M]. Beijing: Science Press, 1998, 30—33[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, 30—33]
- [ 2 ] Zhang K J, Wang X M, Wu W, et al. Advances in conservation biology of Chinese giant salamander *Andrias davidianus* [J]. *Biodiversity and Science*, 2002, 10(3):291—297[章克家, 王小明, 吴巍等. 大鲵保护生物学及其研究进展. 生物多样性, 2002, 10(3):291—297]
- [ 3 ] Murphy R W. Genetic variability among endangered Chinese giant salamanders, *Andrias davidianus* [J]. *Molecular Ecology*, 2000, 9: 1539—1547
- [ 4 ] Graziano P, Gissi C, Chirico A D, et al. Nucleotide substitution rate of mammalian mitochondrial genomes[J]. *J. Mol. Evol.*, 1999, 48: 427—434
- [ 5 ] Sambrook, J, Fritsch E F, Maniatis S T. Molecular Cloning. Cold Spring Harbor[M]. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [ 6 ] Zhang P, Chen Y Q, Liu Y, F, et al. The complete mitochondrial genome of the Chinese giant salamander, *Andrias davidianus* (Amphibia: Caudata) [J]. *Gene*, 2003, 311: 93—98
- [ 7 ] Tan A, Wake D B. mtDNA phylogeography of the California newt, *Taricha torosa* (Caudata, Salamandridae) [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 1995, 4: 383—394
- [ 8 ] Kimball R T, Braun E L, Zwartjes P W, et al. A molecular phylogeny of the pheasants and partridges suggests that these lineages are not monophyletic[J]. *Mol Phylogenet Evol*, 1999, 11: 38—54
- [ 9 ] Barber P H. Patterns of gene flow and population genetic structure in the canyon treefrog *Hyla arenicolor* (Cope) [J]. *Mol Ecol*, 1999, 8(4): 563—576