

江苏省沿海滩涂中华大蟾蜍种群的遗传多样性分析

王兰萍¹, 耿荣庆^{2*}, 朱华杰², 郑慧², 王梦迪², 张子锁²

(1. 盐城师范学院生命科学与技术学院, 江苏盐城 224051; 2. 盐城师范学院药学院, 江苏盐城 224051)

摘要 [目的] 为中华大蟾蜍野生种群资源的保护和合理开发利用提供理论依据。[方法] 通过对中华大蟾蜍线粒体控制区的部分序列进行测序分析, 研究江苏沿海地区中华大蟾蜍不同地域种群的遗传多样性。[结果] 在江苏省沿海滩涂的3个地域检测到中华大蟾蜍种群的6个单倍型类型, 东台种群、大丰种群和射阳种群的个体间享有共享的单倍型类型, 其余单倍型均是各种群独享。系统发育树分析表明, 中华大蟾蜍3个地域种群没有形成明显的地理分布格局。[结论] 各地域种群间既存在着一定程度的基因交流, 也存在一定程度的遗传分化。

关键词 中华大蟾蜍; 线粒体控制区; 遗传多样性; 系统发育树

中图分类号 S917 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2015)08-093-02

Genetic Diversity Analysis of *Bufo gargarizans* Population in the Coastal Wetland of Jiangsu Province

WANG Lan-ping¹, GENG Rong-qing^{2*}, ZHU Hua-jie² et al (1. College of Life Science and Technology, Yancheng Teachers University, Yancheng, Jiangsu 224002; 2. College of Pharmacy, Yancheng Teachers University, Yancheng, Jiangsu 224002)

Abstract [Objective] The research aimed to provide theoretical basis for the protection and reasonable development and utilization of wild resources of *Bufo gargarizans* population. [Method] Based on the sequencing analysis of partial sequence of the mitochondrial control region of *B. gargarizans*, the genetic diversity of different geographical population of *B. gargarizans* in the coastal wetland of Jiangsu Province was studied. [Result] Six haplotypes were detected from three geographical populations in the coastal wetland of Jiangsu Province. The individuals in Dongtai population, Dafeng population and Sheyang population shared the same haplotypes. But the other haplotypes were exclusive. The results of phylogenesis analysis showed that no obvious geographic distribution pattern was found among three geographical populations of *B. gargarizans*. [Conclusion] A certain degree of gene flow and genetic differentiation existed among different geographical populations.

Key words *Bufo gargarizans*; Mitochondrial control region; Genetic diversity; Phylogenetic tree

蟾蜍隶属两栖纲(Amphibia)、无尾目(Anura)、蟾蜍科(Bufonidae)、蟾蜍属(*Bufo*), 在我国各地均有分布, 并且在不同海拔的各种生境中数量都较多。江苏沿海地区中华大蟾蜍(*Bufo gargarizans*)和花背蟾蜍(*Bufo raddei*)都是江苏沿海地区常见的蟾蜍种类^[1], 喜栖息于水边、草丛等阴暗潮湿的地方。它们不仅是农作物害虫的天敌, 而且是一种动物源药材蟾酥的来源。笔者通过对中华大蟾蜍线粒体控制区的部分序列进行测序分析, 探讨江苏省沿海地区中华大蟾蜍不同地域种群的遗传多样性, 以期中华大蟾蜍野生种群资源的保护和合理开发利用提供理论依据。

1 材料与与方法

1.1 样本来源 中华大蟾蜍样本采集自江苏省盐城市沿海滩涂地区, 采用随机抽样的方法分别从东台市、大丰市和射阳县3个地域取样, 每个地域样本数量均为10只。所有样本带回实验室于-80℃下冷冻保存。

1.2 基因组DNA提取、mtDNA控制区PCR扩增及测序 剪取约0.5g的中华大蟾蜍肌肉样本, 采用组织基因组DNA提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司)提取基因组DNA, TE溶解后-20℃下保存备用。

用于扩增mtDNA控制区序列的PCR引物参照文献[2], 上、下游引物序列分别为P1: 5'-GCACGATAGCAAG-GAACAC-3'和P2: 5'-CCGCTTTAAGGTACGATA-3'。引物委

托南京金斯瑞生物科技有限公司合成。

PCR扩增体系(50 μl): 5 μl 10× Buffer, 4 μl 25 mmol/L MgCl₂, 4 μl 2.5 mmol/L dNTPs, 10 pmol/μl 上游、下游引物各为1 μl, 0.3 μl 5 U/μl *Taq* DNA聚合酶, 1 μl 100 ng/μl DNA模板, 余下体积用灭菌超纯水补足。PCR扩增程序: 95℃预变性5 min; 94℃变性30 s, 59℃退火30 s, 72℃延伸30 s, 共35个循环; 72℃延伸10 min, 4℃下保存。

将PCR扩增产物采用1%琼脂糖凝胶电泳进行检测, 使用凝胶回收试剂盒回收纯化, 委托南京金斯瑞生物科技有限公司进行双向测序。

1.3 DNA序列数据分析 所有测序获得的DNA序列使用DNASTAR软件进行编辑、校对和排序, 依据测序峰图手工校正。各个群体单倍型多样性和核苷酸多样性采用DnaSP 4.0^[3]软件计算; 使用Clustal X1.83^[4]软件进行序列的比对, 系统发育分析使用MEGA5.0软件^[5], 分别采用邻接法(NJ)和最小进化法(ME)构建系统进化树, 自展法1000次重复抽样估计系统树中结点的置信水平。

2 结果与分析

2.1 mtDNA控制区序列特征 测序获得的PCR扩增片段经与GenBank数据库中中华大蟾蜍线粒体基因组(NC_008410)比对分析表明, 扩增的mtDNA控制区序列长度均为366 bp, 未发现插入和缺失序列。测定的序列中共发现8个变异位点(图1), 包括6个简约信息位点和1个单一变异位点; A、T、C、G碱基的平均含量分别为36.6%、31.3%、21.0%和11.1%。

单倍型分析表明, 在东台种群中检测到4种类型(DT1、DT2、DT3), 大丰种群中检测到3种类型(DF1、DF2、DF3、

基金项目 江苏省高等学校大学生创新创业训练计划项目(201310324050X)。

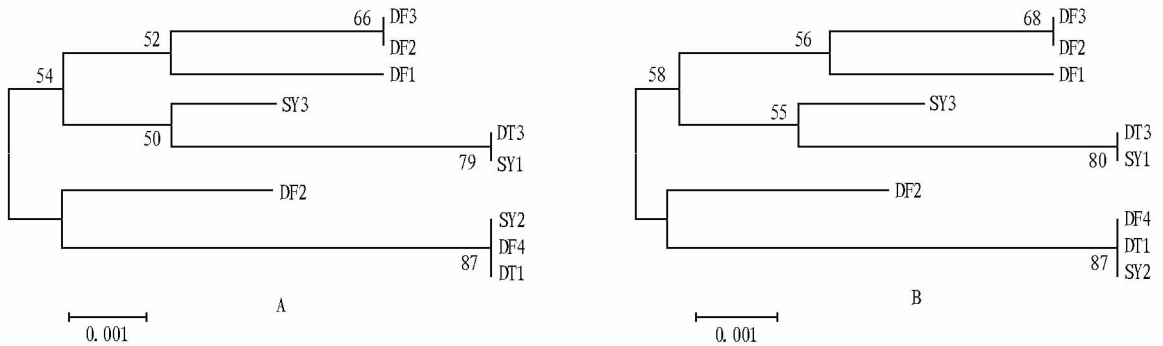
作者简介 王兰萍(1976-), 女, 江苏海门人, 副教授, 硕士, 从事动物学方面的教学与科研工作。*通讯作者, 副教授, 博士, 从事动物学方面的教学与科研工作。

收稿日期 2015-02-09

DF4),射阳种群中检测到3种类型(SY1、SY2、SY3);东台、大丰和射阳种群的单倍型多样性分别为0.711、0.822和0.600,核苷酸多样性则分别为0.00723、0.00777和0.00680(图1)。

```
[ 1112233]
[ 85991135]
[ 61238995]
DT1 GGTCTGAC
DT2 AA . A . T
DT3 A . TAA .
DF1 AAC A . .
DF2 A . . A G.
DF3 AA . A . T
DF4 .....
SY1 A . TAA .
SY2 .....
SY3 AA TA . .
```

图1 单倍型类型及序列比对



注:A.邻接法(NJ);B.最大简约法(ME)。

图2 基于mtDNA控制区单倍型构建的分子系统发育树

低,表明大丰种群的遗传多样性最高而射阳种群的遗传多样性最低,而出现这种状况可能与种群所处的环境相关。通常认为,当1个种群在相当长的时间内比较稳定且资源量丰富时,该种群可能会维持较高的遗传多样性。近年来,由于规模化的沿海滩涂开发、围海造田以及化学污染,在一定程度上大幅度地减少并割裂了江苏省沿海滩涂中华大蟾蜍的栖息地,过度的人工捕捉也造成了其野生种群数量的下降。特别是射阳滩涂受到的人为干扰程度最大,从而可能导致该地域内中华大蟾蜍种群的遗传多样性水平下降。

在江苏省沿海滩涂的3个地域检测到中华大蟾蜍种群的6个单倍型类型,东台种群、大丰种群和射阳种群的个体间享有共享的单倍型类型,其余单倍型均是各种群独享,独享单倍型的存在表明这些地域种群之间已呈现出一定程度的遗传分化。采用不同方法构建的系统发育树更进一步表明,3个不同种群的中华大蟾蜍分属于2个不同的谱系,但这2个分支与地理分布不相关,表明中华大蟾蜍正处于谱系重排(Lineage sorting)阶段而并没有按采样点的地理单元分开。

2.2 分子系统发育分析 采用邻接法和最大简约法构建的中华大蟾蜍mtDNA控制区单倍型之间的系统发育关系如图2所示。从图2可以看出,2种方法构建的系统发育树的拓扑结构完全相同,只是在单倍型的分支顺序上存在差异。基于单倍型序列的分子系统发育树分析表明,中华大蟾蜍的6种单倍型可分为2个分支,每个分支中均包含了东台、大丰和射阳种群中的单倍型类型;东台种群、大丰种群和射阳种群共享了1种单倍型,东台种群和大丰种群、东台种群和射阳种群还分别共享了其他的单倍型。这表明中华大蟾蜍3个地域种群没有形成明显的地理分布格局。

3 讨论

遗传多样性不仅是形成生物多样性的基础,而且是物种进化潜能的保证。遗传多样性水平的下降可能导致物种对环境适应能力的降低,这对生活在野外多变环境中的群体而言是一个极大的威胁^[6-7]。因此,在基因水平上检测种群的遗传多样性有助于了解物种的种群遗传结构和种群历史,进而了解其演化过程,最终有助于制定科学的保护策略。

该研究中从中华大蟾蜍种群的单倍型多样性和核苷酸多样性分析表明,2个参数都是大丰种群最高,而射阳种群最

这说明各地域种群间既存在着一定程度的基因交流,也存在一定程度的遗传分化。

参考文献

- [1] 蒋志刚,丁玉华. 大丰麋鹿与生物多样性[J]. 北京:中国林业出版社, 2011.
- [2] HU Y L, WU X B, JIANG Z G, et al. Population Genetics and Phylogeography of *Bufo gargarizans* in China[J]. *Biochem Genet*, 2007, 45: 697-711.
- [3] ROZAS J, SÁNCHEZ-DELBARRIO J C, MESSEGUER X, et al. DNA Sp, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods[J]. *Bioinform*, 2006, 19: 2496-2497.
- [4] THOMPSON J D, GIBSON T J, PLEWNIAK F, et al. The CLUSTAL - X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25(24): 4876-4882.
- [5] TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, et al. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2011, 28: 2731-2739.
- [6] VRIJJEHOEK R C. Genetic diversity and fitness in small populations. In: *Conservation Genetics* [M]. Basel: Birkhäuser, 1994.
- [7] FRANKHAM R, BALLOU J D, BRISCOE D A. *Introduction to Conservation Genetics* [M]. Cambridge: Cambridge University Press, 2002.