

应用 mtDNA *Cytb* 基因全序列分析中国 5 个马鹿群体的遗传多样性和系统发育

张丽, 滚双宝, 雷天云, 刘丽霞, 秦大伟, 赵世峰

(甘肃农业大学 动物科技学院, 甘肃 兰州 730070)

摘要: 为了在分子水平上探讨马鹿的遗传多样性和系统发育, 对我国 5 个马鹿群体 43 头马鹿 mtDNA *Cytb* 基因全序列进行了分析。结果表明: 5 个马鹿群体 mtDNA *Cytb* 基因全序列中 A、T、G、C 含量没有明显差别; 多态位点占分析位点的 7.63%, 天山马鹿和塔里木马鹿的单倍型比例分别为 100%、50%, 单倍型多样性 (Hd) 分别为 (1.000 ± 0.218) 、 (0.700 ± 0.096) , 核苷酸多样性 (Pi) 分别为 0.003 33、0.005 44, 平均核苷酸差异数值 (K) 分别为 3.800、6.200, 其遗传多样性较丰富。对 13 个马鹿单倍型序列的系统发生分析表明, 我国马鹿有 2 个母系起源。从 GenBank 获得 33 个马鹿 *Cytb* 基因全序列与本研究的马鹿 *Cytb* 基因的单倍型进行网络关系分析, 发现塔里木马鹿与西方马鹿群体具有较近的亲缘关系。

关键词: mtDNA; *Cytb*; 起源; 遗传多样性; 系统发育; 马鹿

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2010)04-0012-05

Analysis of Genetic Diversity and Phylogeny of Five Chinese Subspecies of Wapiti Using Mitochondrial *Cytb* Complete Sequence

ZHANG Li, GUN Shuang-bao, LEI Tian-yun, LIU Li-xia, QIN Da-wei, ZHAO Shi-feng

(Faculty of Animal Sci & Tech, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

Abstract: To examine molecular genetic diversity and phylogeny of wapiti, mitochondrial *Cytb* complete sequence have been analyzed in 43 wapiti from 5 Chinese populations. The results showed that content of A, T, G and C in mitochondrial *Cytb* complete sequence were not significantly different among 5 populations. Diverse loci took 7.63% of analyzed loci. For Tianshan wapiti and Talimu wapiti respectively, haplotypes ratios were 100% and 50%; haplotypes diversity (Hd) were (1.000 ± 0.218) and (0.700 ± 0.096) ; nucleotide diversity (Pi) were 0.003 33 and 0.005 44; average number of nucleotide difference (K) were 3.800 and 6.200. It is suggested that the 5 populations are highly genetic diverse. Analysis on haplotypes phylogeny of 13 wapiti showed that there were 2 maternal origins in China. Comparison between *Cytb* haplotypes of wapiti in this study to those of other 33 wapiti obtained from GenBank has been done using Network relation analysis. The results showed that the Talimu wapiti was phylogenetically close to wapiti populations in the western countries.

Key words: Mitochondrial DNA; Cytochrome b; Genetic diversity; Phylogenetic; Wapiti

动物 mtDNA 是动物体内唯一发现的核外遗传物质, 脊椎动物的 mtDNA 大小在 16.5 kb 左右, 为双链环状 DNA 分子, 以母系遗传方式遗传, 其结构简单、稳定, 世代间没有基因重组且进化速度较快, 能更直观保存群体突变的发生^[1]。mtDNA 比核位点更易受遗传漂变的影响^[2]。利用 mtDNA 多态性

分析不仅可以在一定层面上了解种群的遗传多样性, 还可以探讨群体的起源进化, 是一种非常有用的遗传标记。在 mtDNA 的 13 个蛋白质编码基因中细胞色素 b 基因 (*Cytb*) 的结构和功能是研究最为清楚的, 因此, *Cytb* 成为研究种内或近缘种间系统发育和遗传多样性最常用的工具之一, 它的部分或全序列

收稿日期: 2010-05-15

基金项目: 甘肃省科技攻关项目 (2GS054-A41-002); 甘肃省人事厅创新人才科研资助项目 (036084)

作者简介: 张丽 (1980-), 女, 宁夏石嘴山人, 讲师, 硕士, 主要从事动物遗传育种与繁殖研究。

通讯作者: 滚双宝 (1967-), 男, 甘肃张掖人, 教授, 硕士生导师, 主要从事动物遗传育种与繁殖、特种经济动物饲养研究。

基因测定被广泛应用于动物类群的系统进化和分类研究中^[3,4]。

国内外在 mtDNA 方面开展了大量的研究工作, 被研究的动物涉及到家畜^[5]、家禽^[6]、野兽^[7]、鱼类^[8]、鸟类^[9]、昆虫类^[10]、蛇类^[3]等。但利用 mtDNA 对我国马鹿遗传多样性的研究还不够深入, 特别是对母系起源的研究还未见报道。本研究通过对我国 5 个马鹿群体的 mtDNA 细胞色素 *b* 基因全序列进行测序与分析, 并结合 GenBank 中相关马鹿群体的序列, 研究我国部分马鹿群体的遗传多样性, 构建分子系统树, 揭示其母系起源分衍史, 旨在为我国马鹿群体遗传资源的评价、保护与利用提供分子生物学依据。

1 材料和方法

1.1 材料

在收茸期采集甘肃马鹿 (*C. e. kansuensis*)、青海马鹿 (*Qinghai wapiti*)、天山马鹿 (*C. e. songaricus*)、东北马鹿 (*C. e. xanthopygus*)、塔里木马鹿 (*C. e. yarkandensis*) 5 个马鹿群体共 43 头份血样, 加入 ACD 抗凝剂, 低温下运回实验室保存于 -20°C 冰箱中待用。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取 采用标准蛋白酶 k 消化和常规酚/氯仿抽提的方法提取血样基因组 DNA。

1.2.2 PCR 扩增与序列测定 PCR 扩增反应特异性引物根据 Wada, K., Nakamura, M., Nishibori, M. and Yokohama, M. 提交在 GenBank 中的驯鹿线粒体基因组全序列设计(登录号: NC007704)。上游引物位于驯鹿线粒体 DNA 全序列的 L14176 位点: 5'-GAAAACCATCGTTGTCATTCA-3'; 下游引物位于 H15315 位点: 5'-GGAGGTTGCTAGCTCTCCTTTT-3'。

扩增产物片段长度大约 1 200 bp。引物在 *Cytb* 基因上的相对位置如图 1 所示。引物由大连宝生物公司合成。用 170-9703 型 DNA 扩增仪(美国 BIO-RAD) 进行 PCR 扩增。PCR 反应总体积为 50 μL , 其中 10 \times PCR Buffer 5.0 μL , dNTP 1.0 μL , DNA 模板 2 μL , 上下游引物各 2 μL , *Taq* 酶(东盛) 0.4 μL , 超纯灭菌水 37.6 μL 。PCR 反应体系在 94°C 预变性 5 min, 然后进入如下循环: 94°C 变性 1 min, 55°C 退火 50 s, 72°C 延伸 90 s, 循环次数为 35 个。循环结束后 72°C 再延伸 10 min, 4°C 保存备用。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 扩增产物采用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测其片断大小与浓度, 于 -20°C 保存。产物送至上海生物工程技术服务有限公司进行纯化, 在 ABI

3730 型自动测序仪上双向测序。

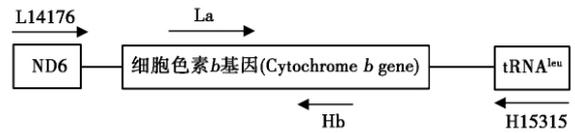


图 1 马鹿线粒体 *Cytb* 基因扩增和测序策略

Fig. 1 Strategy for amplification and sequencing of wapiti mitochondrial cytochrome *b* gene

1.2.3 DNA 序列的数据处理 将两个片段进行拼接后, 先用 Clustal X 1.81 软件排定 DNA 序列, 并辅以人工校对最终获得马鹿 *Cytb* 基因全序列 1 140 bp。用 Dnasp4.10 软件计算单倍型多样性 (Haplotype diversity, Hd) 及核苷酸多样性 (Nucleotide diversity, Pi)。利用 MEGA4.0 软件将本研究马鹿序列与 GenBank 中鹿种的线粒体细胞色素 *b* 基因全序列采用邻接法 (Neighbor-joining, NJ) 和最大简约法 (Maximum-parsimony, MP) 构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 碱基含量与变异位点

中国 5 个马鹿群体 43 个个体 mtDNA *Cytb* 基因全序列分析表明, 所有序列全长均为 1 140 bp。A、T、G、C 碱基构成均没有明显差异, 均以 A、T 的含量占优势, 说明马鹿 mtDNA *Cytb* 基因富含 A 和 T, 符合哺乳动物 mtDNA 碱基组成的基本比例。5 个马鹿群体的序列中有 87 个多态位点, 占分析位点的 7.63%, 包括 32 个转换、2 个颠换, 无插入和缺失, 分别占多态位点的 36.78%、2.30%。

2.2 单倍型与系统发生分析

用 Dnasp4.10 软件统计, 在 43 个马鹿中共存在 13 个单倍型 (Haplotype), 不同群体中发现的单倍型分布见表 1。在天山马鹿群体中检出的单倍型最多, 其值为 6 个, 而青海马鹿群体的单倍型最少, 仅有 1 个。将 43 个马鹿的单倍型序列进行比较, 其中仅甘肃马鹿和青海马鹿共享 1 个单倍型。

在 5 个马鹿群体中, 单倍型比例 (即单倍型数占群体总检测个体数的比例) 在天山马鹿中最高, 其值为 100%, 也就是说天山马鹿没有任何两个个体的 mtDNA *Cytb* 序列是完全重合的; 其次在塔里木马鹿、东北马鹿、甘肃马鹿和青海马鹿中单倍型比例相对较低, 其值分别为 50%、33.30%、15.39%、8.33%。这与群体的选择强度以及现存数量的减少有一定的关系。

单倍型多样性在天山马鹿群体中最高, 为 (1.000 ± 0.096) ; 其次在塔里木马鹿群体中也较高,

表 1 单倍型及群体统计参数

Tab. 1 Haplotype and statistical parameter of groups

群体 Populations	群体含量 No. of sequences	单倍型数 No. of haplotypes	单倍型比例/% Haplotypes proportion	Hd ± SD	Pi	K
塔里木马鹿	6	3	50.00	0.700 ± 0.218	0.005 44	6.200
天山马鹿	6	6	100.00	1.000 ± 0.096	0.003 33	3.800
东北马鹿	6	2	33.30	0.455 ± 0.500	0.001 12	1.267
甘肃马鹿	13	2	15.39	0.154 ± 0.126	0.000 88	1.000
青海马鹿	12	1	8.33	0.000 ± 0.000	0.000 00	0.000

注: Hd. 单倍型多样性(Nei ,1987); SD. 单倍型多样性标准误; Pi. 核苷酸多样性(Nei ,1987); K. 样本中所有单倍型对两两间的平均核苷酸差异数(Tajima ,1983)。

Note: Hd. Haplotype diversity(Nei ,1987); SD. Standard Deviation of Haplotype diversity; Pi. Nucleotide diversity(Nei ,1987); K. Mean number of differences between all pairs of haplotypes in the sample(Tajima ,1983) .

值为 (0.700 ± 0.218) ; 在东北马鹿和甘肃马鹿群体中较低 , 分别为 (0.455 ± 0.500) 和 (0.154 ± 0.126) ; 在青海马鹿群体中最低 , 仅为 0 , 这可能是因为青海马鹿群体太单一。这与单倍型比例所反映的结果基本一致。核苷酸多样性在塔里木马鹿中最高 , 为 0.005 44; 其次是天山马鹿、东北马鹿和甘肃马鹿 , 分别为 0.003 33 , 0.001 12 , 0.000 88; 在青海马鹿中最低 , 值为 0。平均核苷酸差异数 (K) 在塔里木马鹿中为最高 , 为 6.200; 其次是天山马鹿、白唇鹿、东北马鹿、甘肃马鹿 , 值分别为 3.800 , 3.167 , 1.267 , 1.000; 在青海马鹿中最低 , 仅为 0。说明塔里木马鹿和天山马鹿的遗传多样性较丰富 , 东北马鹿、甘肃马鹿和青海马鹿遗传多样性相对贫乏。

基于本研究的序列数据与从 GenBank 中检索获得的 33 条近缘马鹿群体的细胞色素 *b* 基因全序列 , 采用邻接 (NJ) 法构建系统发生树 (Kimura 2- μ -parameter 法) 表明: 这 13 个单倍型分为明显的 2 支 (图 2) : 呈现出上支含有最多的单倍型序列 , 下支最少。因此 , 可以认为我国马鹿群体有两个相对独立的母系起源。

2.3 mtDNA *Cytb* 基因全序列的网络关系分析

Christian J 等^[16]把世界野生马鹿构想了三种假设 , 其中一种假设为: 世界马鹿分为三个群体: 西方马鹿群体 (包括欧洲亚种) 、塔里木马鹿和东方马鹿群体 (指北美亚种和中国产其他亚种包括新疆的阿尔泰亚种、天山亚种和分布于青海、甘肃、宁夏、四川、辽宁、吉林和黑龙江等省区的亚种) 。为了进一步探讨我国马鹿的母系起源 , 从 GenBank 中获取 33 个 mtDNA *Cytb* 基因全序列 , 并将它们与我国马鹿的 13 个单倍型序列进行比较分析 , 共发现 39 个单倍型: 西方马鹿群体有单倍型 Hap-1 - Hap-19; 塔里木马鹿有单倍型 Hap-20、Hap-21、Hap-22; 东方马鹿群体有单倍型 Hap-23 - Hap-39 , 其中东北马鹿有单倍型 Hap-23、Hap-24; 天山马鹿有单倍型 Hap-29 - Hap-30、Hap-32 - Hap-35; 甘肃马鹿有单倍型 Hap-

36 和 Hap-37; 青海马鹿有单倍型 Hap-36。对这 39 个单倍型进行网络关系分析 , 结果明显分为 3 部分 (图 3) : 上支为引用的西方马鹿群体单倍型 , 左下支为塔里木马鹿的三个独立的单倍型 , 右下支为天山马鹿、东北马鹿、甘肃马鹿和青海马鹿以及引用的中国产其他马鹿和北美马鹿单倍型。西方马鹿群体将我国马鹿群体一分为二 , 这说明塔里木马鹿与西方马鹿有着较近的亲缘关系。因此 , 可以认为我国马鹿有两个母系起源 , 且一个母系起源与西方马鹿群体有关 , 这与系统发生树得出的结论是一致的。

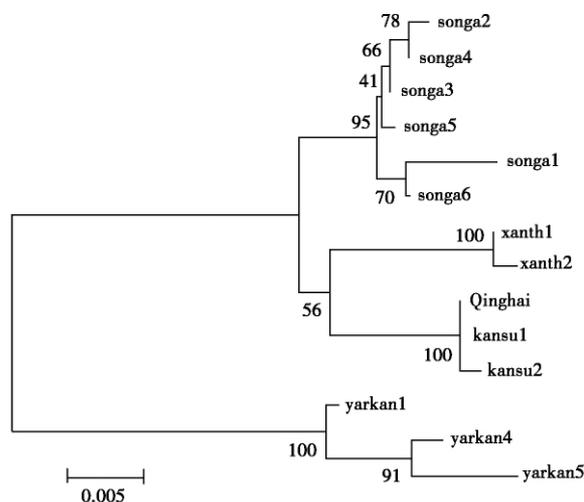


图 2 使用邻接法构建的 13 个单倍型的系统发生树

Fig. 2 Neighbor-joining phylogenetic tree constructed from the 13 *Cytb* haplotypes identified in wapiti populations

3 讨论

3.1 遗传多样性

遗传多样性是估计种群长期生存可能性重要指标 , 也是生物学上制定保护计划所必需的内容之一。遗传多样性的丧失会引起个体繁殖适合度的下降。单倍型多样性值 (Hd) 和核苷酸多样性值 (Pi) 是衡量一个群体 mtDNA 变异程度的两个指标。Hd 值是单倍型多样性 , 指样本中随机抽取到两个不同单倍

型的频率; P_i 值是核苷酸多样性, 指序列间每个位点的平均核苷酸差异数。Hd 值和 P_i 值越大, 群体的多态程度越高, 遗传多样性越丰富。

从 mtDNA *Cytb* 基因序列水平上看, 东北马鹿、甘肃马鹿和青海马鹿的单倍型多样性较低, 核苷酸多样性值更低于认为是较低范围的 P_i 值 (0.15% ~ 0.47%)^[13], 表明这三个群体的遗传多样性相对贫乏。分析这种原因主要是因为所研究的马鹿群体都是以圈养为主, 圈养种群的数量过低, 则不可避免的

会发生近亲繁殖, 社群间缺少基因交换, 遗传逐渐衰竭, 使其生命力和繁殖力下降, 疫病增加, 从而危及种群生存。尽管塔里木马鹿和天山马鹿群体的核苷酸多样性值较高些, 这与其他珍稀野生动物相比, 是很低的, 如藏羚羊^[14]的线粒体核苷酸多样性值为 2.96%, 太平洋白鳍豚^[15]的线粒体核苷酸多样性值为 1.65%。因此, 制定科学有效的保护政策应当以保护物种的遗传多样性为主要内容。这一研究结果也再次提醒我们保护马鹿的遗传多样性已刻不容缓。

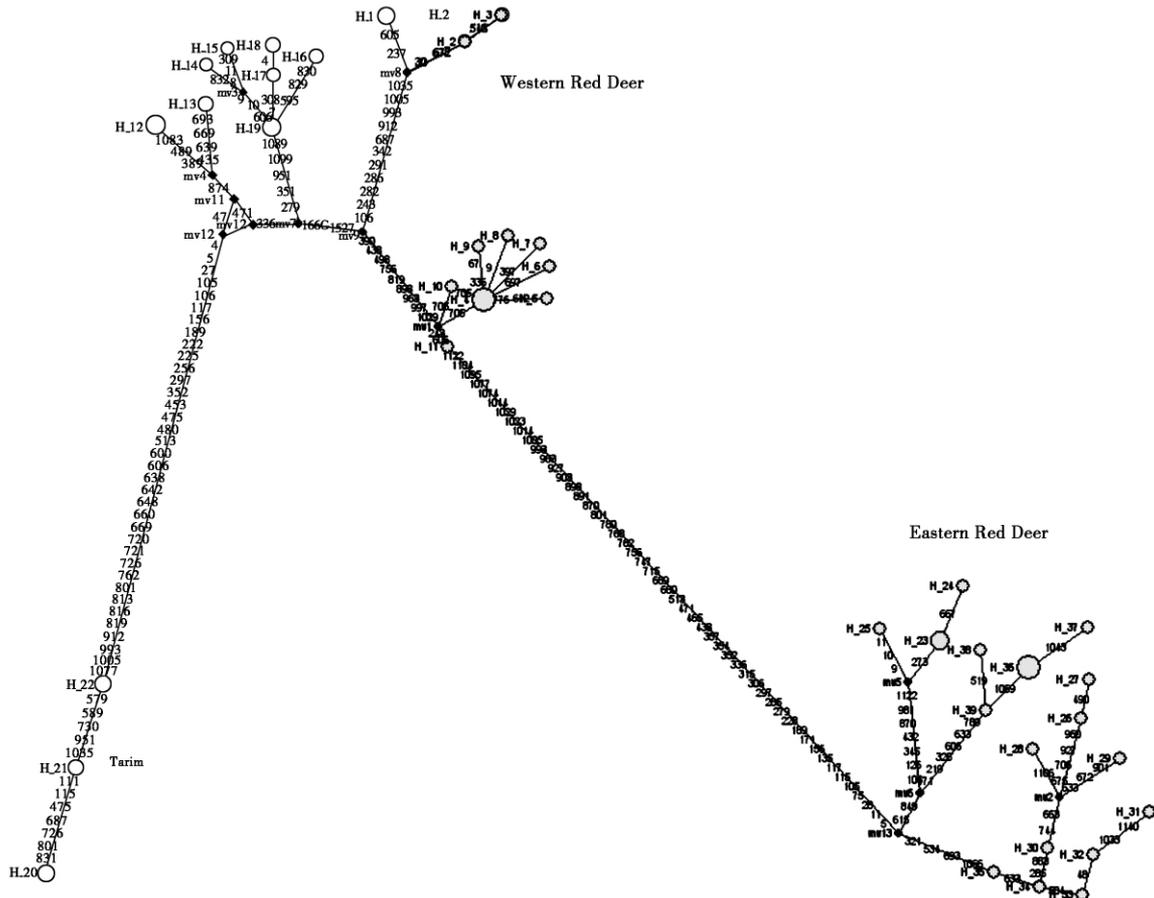


图 3 39 个单倍型的网络关系

Fig. 3 Network relationship of the 39 haplotypes

3.2 系统发育

mtDNA 是核外遗传物质, 符合母系遗传的特点, 在母系起源与驯化研究中具有重要的意义。马合木提·哈力克博士^[17]根据新疆马鹿塔里木亚种、天山亚种和阿尔泰亚种头骨 14 项测量指标的主成分分析结果显示, 塔里木亚种的头骨形态短而宽, 明显地区别于其他 2 个亚种。这一发现和论断已得到欧美国家不少动物学家的认可。新疆地区为两大系统的分界, 是马鹿系统进化和分散的重要区域。在西部系统中, 塔里木马鹿的分子序列比欧洲马鹿还要原始, 证明塔里木野生马鹿就是欧洲马鹿的祖先。而在此前, 国内外动物学界普遍认为, 全世界野生马鹿的祖先是西藏马鹿。这一发现事实上对原有“大

陆间马鹿迁移学说”作出了修正。此前, 动物学界普遍认为, 在数万年前, 西藏马鹿从青藏高原向西迁徙到欧洲平原, 然后向东迁徙到亚洲北部和北美地区。而在新迁移学说中, 西藏马鹿从未西迁, 而是向东、向北长途跋涉, 最终通过冬季结冰的白令海峡到达北美, 在包括准噶尔盆地在内的亚洲北部和北美地区形成了东部系统野生马鹿的各个亚种。一部分向西部迁徙的塔里木野生马鹿则最终经过长途跋涉在欧洲安家落户, 与留在中亚地区的种群形成马鹿的西部系统。

本研究进一步证实了塔里木马鹿与东方马鹿群体之间的亲缘关系相对较远, 与西方马鹿群体之间的亲缘关系较近, 从属于西方马鹿系统。笔者认为

我国马鹿的起源有两个,具体起源的来源还有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] Bullerwell C E ,Gray M W. Evolution of the mitochondrial genome: protest connections to animals ,fungi and plants [J]. Current Opinion in Microbiology ,2004 ,7(5) : 528 - 534.
- [2] Birky C W Jr ,Fuerst P ,Maruyama T. Organelle gene diversity under migration ,mutation ,and drift: equilibrium expectations ,approach to equilibrium ,effects of heteroplasmic cells ,and comparison to nuclear genes [J]. Genetics ,1989 ,121(3) : 613 - 627.
- [3] 周继亮,张亚平,黄美华,等. 蝮亚科蛇线粒体细胞色素 *b* 基因序列分析及其系统发育 [J]. 动物学报, 2001 ,47(4) : 361 - 366.
- [4] Helm-Bychowski K ,Cracraft J. Recovering phylogenetic signal from DNA sequences: relationships within the corvine assemblage (class aves) as inferred from complete sequences of the mitochondrial DNA cytochrome-*b* gene [J]. Mol Biol Evol ,1993 ,10: 1196 - 1214.
- [5] 曹丽荣. 从细胞色素 *b* 基因全序列分析岩羊和山羊、绵羊的系统发生关系 [J]. 兽类学报, 2004 ,24(2) : 109 - 114.
- [6] 陈艳荣. 家鹅细胞色素 *b* 基因序列进化研究 [J]. 畜牧兽医学报, 2006 ,37(8) : 834 - 840.
- [7] 白素英. 黑熊四川亚种线粒体 DNA *Cytb* 基因的克隆及全序列分析 [J]. 经济动物学报, 2004 ,8(2) : 98 - 101.
- [8] 章 群. 鳃类系统发育线粒体 *Cytb* 基因全序列分析 [J]. 生态科学, 2006 ,25(5) : 430 - 432.
- [9] 潘巧娃. 基于 *Cytb* 的鸺亚科部分鸟类的系统进化 [J]. 动物学报, 2006 ,52(1) : 87 - 98.
- [10] 代金霞. 蜻科部分昆虫细胞色素 *b* 基因序列及其系统发育关系得探讨 [J]. 动物学研究, 2004 ,25(5) : 397 - 402.
- [11] 陈 伟. 中国北方汉族人 mtDNA D 环多态性研究 [J]. 中华医学遗传学杂志, 1999 ,16(4) : 246 - 248.
- [12] Mahmut H ,Masuda R ,Onurna M. *et al.* Molecular phylogeography of the Red Deer(*Cervus elaphus*) populations in Xinjiang of China: comparison with other Asian ,European ,and North American populations [J]. Zoological Science ,2002 ,19: 485 - 495.
- [13] Lan H ,Shi L M. The origin and genetic differentiation of native breeds of pigs in southwest China: An approach from mitochondrial DNA polymorphism [J]. Biochemical Genetics ,1993 ,31: 51 - 60.
- [14] 周 慧,李迪强,张于光,等. 藏羚羊 mtDNA D-Loop 区遗传多样性研究 [J]. 遗传, 2006 ,28(3) : 299 - 305.
- [15] Hayano A ,Yoshioka M ,Tanaka M ,*et al.* Population differentiation in the Pacific white-sided dolphin *Lagenorhynchus obliquidens* inferred from mitochondrial DNA and microsatellite analyses [J]. Zoological Science , 2004 ,21(9) : 989 - 999.
- [16] Christian J Ludt ,Wolf Schroeder ,Oswald Rottmann ,*et al.* Mitochondrial DNA phylogeography of red deer(*Cervus elaphus*) [J]. Molecular Phylogenetics and Evolution ,2004 ,31: 1064 - 1083.
- [17] Malmmt H. Studies on Genetic and Morphological Characteristics and Conservation of the Red Deer(*Cervus elaphus*) in Xinjiang ,China. Doctoral Dissertation [M]. Hokkaido University: Graduate School of Veterinary Medicine ,2002: 83 - 92.