

基于线粒体细胞色素 *b* 基因序列的阿尔金山野生双峰驼分子系统发育研究

张 勇¹, 张会斌², 刘志虎², 吴 敏^{1*}

(1. 浙江大学 生命科学学院, 浙江 杭州 310058; 2. 新疆阿尔金山国家自然保护区管理处, 新疆 841000)

摘 要: 目前对于野生双峰驼作为一个独立种的有效性还有着较多争议. 研究测定了 2 头阿尔金山野生双峰驼个体的线粒体细胞色素 *b* 基因序列, 并结合已有的双峰驼细胞色素 *b* 基因序列进行了系统发育分析. 结果表明: 现有的双峰驼分为 2 个种群: 新疆种群和甘肃种群; 2 个种群间的遗传距离为 2.4%~3.0%, 尚未达到种间水平; 阿尔金山野生双峰驼属于新疆种群, 不能作为一个独立的种.

关 键 词: 双峰驼; 种; 细胞色素 *b* 基因; 系统进化

中图分类号: Q939

文献标识码: A

文章编号: 1008-9497(2008)01-087-05

ZHANG Yong¹, ZHANG Hui-bin², LIU Zhi-hu², WU Min¹ (1. College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China; 2. Altun Mountain National Nature Reserve Administration, Xinjiang 841000, China)
Molecular phylogeny of Altun Mountain wild *Camelus bactrianus* revealed by partial cytochrome *b* gene sequences of mitochondrial DNA. Journal of Zhejiang University(Science Edition), 2008, 35(1): 87~91

Abstract: It is still under dispute if the wild *Camelus bactrianus* is a distinct species or not. The cytochrome *b* (Cyt *b*) gene of mitochondrial DNA from two Altun Mountain wild *Camelus bactrianus* samples was sequenced and analyzed with the available Cyt *b* gene sequences of *Camelus bactrianus* in GenBank. The result showed that the existent *Camelus bactrianus* could be distinguished into two populations, Xinjiang and Gansu. The genetic distance between the two populations was 2.4%~3.0%, which is not enough to reach the species level. It could be concluded that Altunshan wild *Camelus bactrianus* should not be treated as a distinct species.

Key words: wild *Camelus bactrianus*; species; Cyt *b* gene; phylogeny

双峰驼 (*Camelus bactrianus*) 在分类学上属于偶蹄目 (Artiodactyla), 胼足亚目 (Tylopoda), 骆驼科 (Camelidae), 骆驼属 (*Camelus*), 是沙漠、戈壁地域中特有一个畜种, 对荒漠干旱地区的环境有独特的适应性, 赢得了“沙漠之舟”的美称^[1]. 目前, 双峰驼主要分布在中国西部和蒙古国境内, 且大多数为人工驯养的双峰驼, 估计全世界野生双峰驼的总数不足 1 000 头^[2,3]. 因此, 对野生双峰驼的保护遗传学研究已经迫在眉睫. 目前, 野生双峰驼保护遗传学研究所面临的主要问题是野生双峰驼和家养双峰驼之间的系统进化关系的界定. 有些研究认为野生双峰驼是家养双峰驼野化而成的, 而原始的野生双峰驼已经灭绝; 而另一些研究认为野生双峰驼是独立

于家养双峰驼的一个种, 并且是家养双峰驼的祖先^[2~4]. 这就需要首先从野生双峰驼的系统发育研究入手, 解决野生双峰驼的分类问题. 已有的双峰驼分类学研究主要以形态学、生理学特征为基础, 分子水平的研究相对较少.

线粒体 DNA 由于具有母系遗传、进化速度快、近缘种间解析灵敏度高、易于提取以及可重复性好等特点而成为从分子水平研究系统发育关系的主要研究对象^[5]. 研究表明, 线粒体 DNA 的 Cyt *b* (cytochrome *b*, Cyt *b*) 基因的种间分歧度为 1%~10%, 这一分歧度既能区别物种, 又可忽略多重替换^[6]. 因此, Cyt *b* 基因被认为是探讨近缘种间和种内遗传分化程度的良好指标, 在系统进化和分类研究中有较

收稿日期: 2006-11-14.

作者简介: 张 勇 (1980-), 男, 硕士, 主要从事动物分子演化研究.

* 通讯作者: 吴 敏, 教授, 主要从事动物分子演化研究.

强的适用性^[7], 是进行种级水平上的系统分化研究时最常用的分子遗传标记^[8~11]. 本研究拟通过对 Cyt *b* 基因序列的分析来探讨双峰驼的系统进化以及野生双峰驼的分类地位问题.

由于人类对野生双峰驼几千年来猎杀和生存环境的恶劣, 野生双峰驼对人的警惕性特别高, 通常在几百米之外看到人就会逃走, 很难获得活体组织样本; 此外, 野生双峰驼生存的环境风沙大、气候干燥, 对其毛发和粪便的收集也异常困难^[2]. 这些都在一定程度上限制了对野生双峰驼的研究. 新疆阿尔金山国家自然保护区的工作人员在一次偶然的会中得到了两头死亡野生双峰驼的皮样, 并赠送了部分皮样给我们, 这是研究野生双峰驼非常难得的样本. 本实验室以这两头野生双峰驼的皮样为材料, 基于 Cyt *b* 基因序列对野生双峰驼进行了分子系统发育学研究.

1 材料和方法

1.1 材料来源

野生双峰驼干皮样 2 份, 均来自新疆阿尔金山国家自然保护区.

1.2 总 DNA 的提取

将皮样除去毛发后, 参照对兰宏等^[12]的方法消化皮样, 适当修改了一些步骤. 采用标准酚氯仿抽提法及乙醇沉淀法得到总 DNA^[13], 操作过程中设空白对照.

1.3 细胞色素 *b* 基因的扩增及序列测定

根据 GenBank 已有的双峰驼序列^[14]用 Primer Premier5 设计引物 L14772 (5'-ATG ACA AAC ATC CGA AAA TCA CAC C-3') 和 H15863 (5'-TCT TCA TTT TAG GAT ACG GTT TTC A-3'), 其中 L、H 分别代表线粒体 DNA 的轻链和重链, 相应的数字表示引物的 3' 端在人的线粒体基因序列上的对应位置^[15]. PCR 反应体系为 50 μ L, 体系组成如下: 10 \times 反应缓冲液 5 μ L, 10 mmol/L dNTPs 1 μ L, 20 μ mol/L 引物各 1 μ L, Taq 酶 1.25U, 模板约 200 ng, 用 Milico 水补足体系. 反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 60 s, 52 $^{\circ}$ C 60 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s, 共进行 32 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min. PCR 反应在 PTC-100 型热循环仪上进行, 操作过程中设空白对照. 取 5 μ L 反应液在 1.0% 的琼脂糖凝胶上进行电泳检测. PCR 产物由北京诺赛基因组研究中心有限公司用 ABI3730XL 型自动测序仪上测序.

1.4 序列分析及系统重建

将测得的 2 个阿尔金山野生双峰驼序列和从 GenBank 中下载的 9 个双峰驼序列 (序列号为 AY126618.1~AY126625.1, CBU06427) 以及 1 个单峰驼 (*Camelus dromedarius*) 序列 (序列号为 X56281) 输入 Mega3.1^[16] 进行同源序列比对, 并进行手工核查. 在此基础上用 Mega3.1 计算不同序列间的变异位点数、简约信息位点数、颠换百分比、转换/颠换比率、序列间的差异百分比和遗传距离. 用 Mega3.1 软件基于 Kimura 2-parameter 距离采用邻近法 (Neighbor Joining, NJ) 构建分子系统树, 同时使用该软件的 Heuristic 功能搜索最大简约法 (Maximum Parsimony, MP) 的系统重建. 均以单峰驼为外群, 系统树各分支的置信度由重抽样法 (Bootstrap) 1000 次重复检测, DNA 序列变异中的转换和颠换赋予相同的加权值.

2 结果

2.1 Cyt *b* 基因序列及其变异

PCR 扩增得到的阿尔金山野生双峰驼 2 个个体的 Cyt *b* 基因的全长产物 1140bp, 测序得到其中 1074bp 的序列, 发现这 2 个样品的序列完全相同. 将这 2 个序列 (已提交 GenBank, *C. bactrianus* Altunshan 1 序列号为 EF076246, *C. bactrianus* Altunshan 2 序列号为 EF076243) 与 GenBank 已有的 9 个双峰驼序列进行比对发现: 这部分 Cyt *b* 基因序列对应于 358 个氨基酸; 有 36 个位点为变异位点, 其中简约信息位 29 个碱基替换多发生在密码子第三位 (25 个). T、C、A、G 的平均含量分别为 28.1%、28.5%、27.9%、15.4%, 其中 T 在密码子第二位的含量高达 42%, 而 G 碱基的含量相对缺乏, 尤其是密码子第三位的 G 碱基含量仅为 8.5%. 核苷酸的替换以转换为主 (平均转换/颠换数为 15.40/1.16). 不同双峰驼个体碱基替代情况和遗传距离见表 1. 作为外群的单峰驼和双峰驼各个体之间的遗传距离为 0.110~0.120; 双峰驼 11 个个体可分为 2 个不同的种群 (新疆种群: *C. bactrianus* Altunshan 1、*C. bactrianus* Altunshan 2、*C. bactrianus* Gobi 6、*C. bactrianus* Arjin 5、*C. bactrianus* Gobi 5; 甘肃种群: *C. bactrianus* X、*C. bactrianus* Anxi 12、*C. bactrianus* Anxi 2、*C. bactrianus* Wuwei 29、*C. bactrianus* Wuwei 32、*C. bactrianus* Mongolia 3), 新疆种群内各个体之间的遗传距离为 0.000~0.004, 甘肃种群内各个体之间的遗传距离为 0.001~0.006, 2 个种群间

个体之间的遗传距离为 0.024~0.030. 另外,新疆各个体的碱基替换以转换为,甘肃种群内各个体的碱基替换以颠换为主

表 1 各种间的转换/颠换(左下角)和遗传距离(Kimura 2-parameter 模型,含转换与颠换,右上角)

Table 1 Numbers of transitions/transversions (lower-left matrix) and Genetic distances (Kimura 2-parameter model, transition+transversion, upper-right matrix) for different species

Cyt <i>b</i> source	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1 <i>C. b.</i> Altunshan 1		0.000	0.004	0.003	0.003	0.027	0.028	0.028	0.029	0.029	0.030	0.120
2 <i>C. b.</i> Altunshan 2	2 0/0		0.004	0.003	0.003	0.027	0.028	0.028	0.029	0.029	0.030	0.120
3 <i>C. b.</i> Gobi 6	1/3	1/3		0.001	0.002	0.025	0.026	0.026	0.027	0.027	0.028	0.120
4 <i>C. b.</i> Arjin 5	0/3	0/3	1/0		0.001	0.024	0.025	0.025	0.026	0.026	0.027	0.119
5 <i>C. b.</i> Gobi 5	0/3	0/3	2/0	1/0		0.025	0.026	0.026	0.027	0.027	0.028	0.120
6 <i>C. b.</i> X	25/3	25/3	26/0	25/0	26/0		0.001	0.001	0.002	0.002	0.004	0.111
7 <i>C. b.</i> Anxi 12	26/3	26/3	27/0	26/0	27/0	1/0		0.002	0.001	0.001	0.005	0.112
8 <i>C. b.</i> Anxi 2	26/3	26/3	27/0	26/0	27/0	1/0	2/0		0.003	0.003	0.005	0.110
9 <i>C. b.</i> Wuwei 29	27/3	27/3	28/0	27/0	28/0	2/0	1/0	3/0		0.002	0.006	0.113
10 <i>C. b.</i> Wuwei 32	27/3	27/3	28/0	27/0	28/0	2/0	1/0	3/0	2/0		0.006	0.113
11 <i>C. b.</i> Mongolia 3	27/4	27/4	28/1	27/1	28/1	3/1	4/1	4/1	5/1	5/1		0.116
12 <i>C. dromedarius</i>	109/6	109/6	112/3	111/3	112/3	104/3	105/3	1103/3	106/3	106/3	107/4	

2.2 系统进化树

基于双峰驼 Cyt *b* 基因部分序列以 MP、NJ 法构建的系统树基本相同(见图 1).

3 讨 论

骆驼科在始新世时期出现于北美洲,距今约 4 000~4 500 万年. 已有的化石记录表明骆驼科大概在 11 百万年前分化成骆驼族和羊驼族^[17,18],而此二者之间的 Cyt *b* 基因序列差异为 17.3%~19.6%,故骆驼科的碱基替换速率为每百万年 1.6%~1.8%^[14]. 从得到的数据来看双峰驼主要分为两个种群(新疆种群、甘肃种群),其基因序列差异为 2.4%~3.0%,推断二者在距今大约 150 万年前分化. 骆驼科其他属的种间差异为:1.8%~6.7%,种

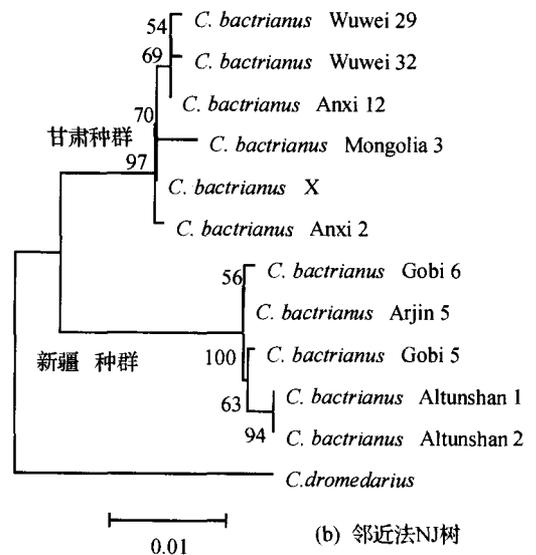
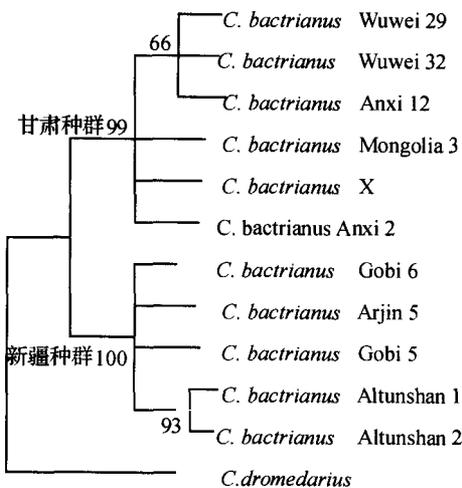


图 1 基于 Cyt *b* 基因部分序列构建的双峰驼种群分子系统树
Fig. 1 Phylogenetic trees of the *C. bactrianus* based on Cyt *b* sequences data

图中数字为自举支持率,未给出小于 50 的节点支持率
Numbers above branches are percentage bootstrap supporting values (1 000 replications). Values less than 50 are not shown

内差异为 1.2%~2.5%^[14];双峰驼 2 个种群之间的差异已超出了种内差异,但尚未达到种间差异水平. 权洁霞等^[1]对中国家养双峰驼 3 个种群的 RFLP 分析表明我国家养双峰驼在线粒体 DNA 水平存在较丰富的遗传多样性,由于线粒体的母性遗传特性,这也从另一个方面说明了家养骆驼的祖先有着丰富的遗传多样性. 上述研究结果表明,双峰驼的新疆种群和甘肃种群可能是由 2 个不同的原始双峰驼祖先种群演化而来的.



(a) 最大简约法 MP 树

骆驼族大概是在第三纪晚期和第四纪的早更新世初期从北美迁移到亚欧大陆的. 由于地理因素的制约, 这一时期中国境内的原始双峰驼只是生活在北方; 而此区域内并没有限制原始双峰驼种群自然迁移的地理隔离带, 所以, 中国境内的原始双峰驼出现较大进化分歧的可能性很小. 但是, 古天山山脉和古阿尔泰山山脉限制了中国境内的原始双峰驼和中亚地区的原始双峰驼之间的基因交流, 二者出现较大进化分歧的可能性较大(见图 2). 综合生物学和

古地理学知识推测, 甘肃双峰驼种群的原始祖先应该是在第三纪晚期、早更新世初期从现在的蒙古国经过内蒙古进入我国境内的, 曾经广泛地分布在中国的北方; 新疆双峰驼种群的原始祖先则是在全新世以后由于气候、人类活动等影响从中亚经新疆进入我国境内的, 而且其分布范围也大为缩小, 仅在新疆和甘肃西部有分布. 由于二者在此前地质时期的生存环境被隔离, 所以造成了这 2 个不同的双峰驼种群具有如此明显的遗传分化.

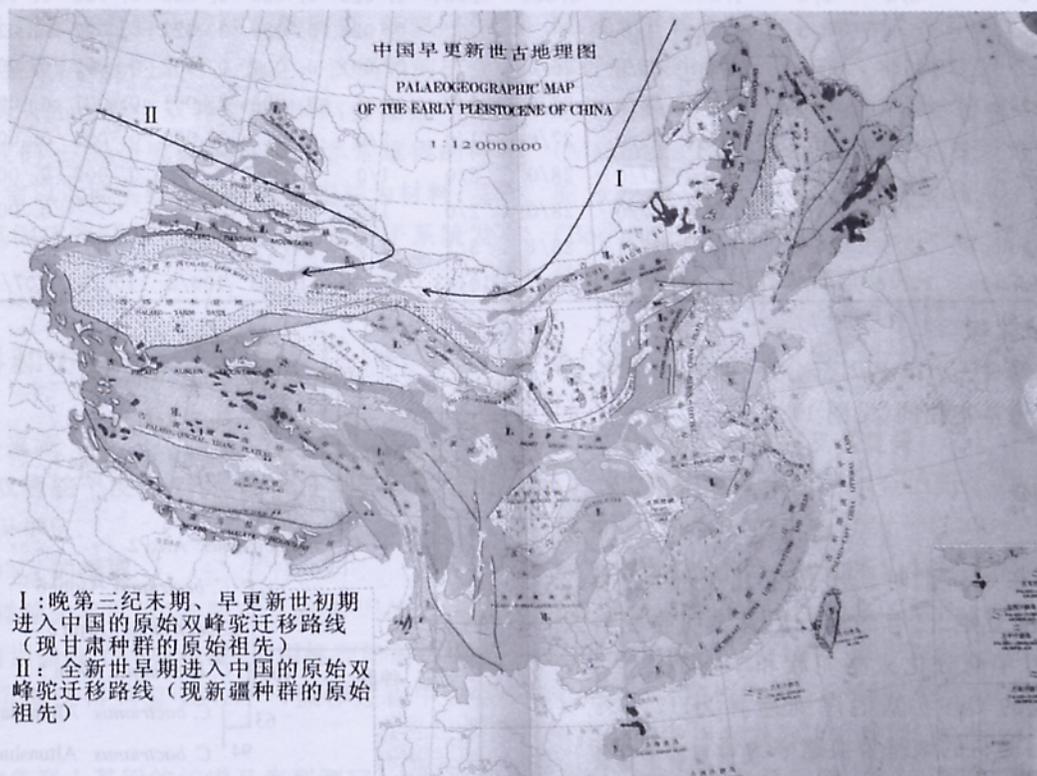


图 2 中国野骆驼原始祖先的迁移路径图(原图引自《中国古地理图集》^[20] P137~138)

Fig. 2 The migration of ancestral *Camelus bactrianus* in China

因为存在家养双峰驼野化以及原始祖先种群不同等多种因素的影响, 根据遗传距离对野生双峰驼和家养双峰驼所做的鉴定显然可信度不够. Han Jianlin 等^[4]根据限制性片断长度多态性(RFLP)的分析, 发现野生双峰驼和家养双峰驼的线粒体基因的酶切条带存在差异, 袁国映等^[2]以此作为野生双峰驼是不同于家养双峰驼的分子学证据. 但是, 这一结论的得出没有考虑到作为样本的野生双峰驼和家养双峰驼是从 2 个不同的原始祖先种群演化而来的可能性. 人类对双峰驼的驯养大概开始于 5 000~6 000 年前^[19], 如此短的时间不足以使家养双峰驼和野双峰驼之间形成超越种内差异的分化. 因此, 从群体遗传学的角度考虑, 今后应对整个双峰驼种进行遗传进化分析, 以确定双峰驼种下是否有隐藏种或者亚种. 从保护遗传学的角度考虑, 对野生双峰驼

的研究应着眼于不同栖息地内种群遗传多样性及不同栖息地间遗传多样性和杂合度的研究, 从而制定合理的保护措施既能保护野生双峰驼的生存又能使其免受家养双峰驼的基因杂交的影响.

本研究得到的样品数有限, 不能得到全部所需信息, 因此, 双峰驼的遗传分化研究还有待进一步深入.

感谢新疆阿尔金山国家自然保护区管理处管理人员为本研究提供所需样品.

参考文献 (References):

- [1] 权洁霞, 张亚平, 韩建林, 等. 家养双峰驼线粒体 DNA 遗传多样性的研究[J]. 遗传学报, 2000, 27(5): 383-390.

QUAN Jie-xia, ZHANG Ya-ping, HAN Jian-ling, et al. Genetic diversity of mtDNA of Domestic Camels (*C. bactrianus*) [J]. *Acta Genetica Sinica*, 2000, 27(5):383-390.

[2] 袁国映,张莉,袁磊. 2000年的世界新物种——野双峰驼[M]. 乌鲁木齐:新疆青少年出版社, 2001:14-15, 24-29.

YUAN Guo-ying, ZHANG Li, YUAN Lei. A Kind of World New Species Mammal Animal of 2000-Wild Bactrian Camels[M]. Wulumuqi: Xinjiang Juvenile Publishing House, 2001:14-15, 24-29.

[3] 张莉,袁磊. 世界野双峰驼各分布区食性分析[J]. *新疆环境保护*, 1996, 19(3):60-64.

ZHANG Li, YUAN Lei. Food-habits of wild Bactrian Camels in different regions of the world[J]. *Environmental Protection of Xinjiang*, 1996, 19(3):60-64.

[4] HAN Jian-lin, QUAN Jie-xia, MEN Zhen-ming, et al. Rapid communication: three unique restriction fragment length polymorphisms of *EcoRI*, *PvuII*, and *ScaI* Digested mitochondrial DNA of Bactrian Camels (*Camelus bactrianus ferus*) in China [J]. *J Anim Sci*, 1999, 77(8):2315-2316.

[5] 曾晓茂. 中国西部小鼯的分子系统发育研究[D]. 上海:华东师范大学生命科学院, 2004.

ZENG Xiao-mao. The Phylogenetic Study of Western Hynobiids in China[D]. Shanghai: College of Life Sciences, East China Normal University, 2004.

[6] MORTZ C, DONLING T E, BROWN W M. Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics [J]. *Annu Rev Ecol Syst*, 1987, 18:269-292.

[7] IRWIN D M, KOCHER T D, WILSON A C. Evolution of the cytochrome *b* gene of mammals [J]. *J Mol Evol*, 1991, 32:128-144.

[8] WAN Qiu-hong, WU Hua, FUJIHARA T, et al. Which genetic marker for which conservation genetics issue? [J]. *Electrophoresis*, 2004, 25:2165-2176.

[9] KOCHER T D, THOMAS W K, MEYER A, et al. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers [J]. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 1989, 86:6196-6200.

[10] 向余劲攻,杨岚,张亚平. 白腹锦鸡和红腹锦鸡的遗传分化[J]. *遗传*, 2000, 22(4):225-228.

XIANG Yu-jing-gong, YANG Lan, ZHANG Ya-ping. Sequence divergence between *Chrysolophus amherstiae* and *Chrysolophus pictus* [J]. *Hereditas*, 2000, 22(4):225-228.

[11] 刘向华,王义权,刘忠权,等. 从 Cyt *b* 基因序列探讨鹿亚科动物的系统发生关系[J]. *动物学研究*, 2003, 24(1):27-33.

LIU Xiang-hua, WANG Yi-quan, LIU Zhong-quan, et al. Phylogenetic relationships of Cervinae based on sequence of mitochondrial cytochrome *b* gene [J]. *Zoological Research*, 2003, 24(1):27-33.

[12] 兰宏,王文,施立明. 鹿属动物陈旧皮张标本的 DNA 提取及 PCR 扩增[J]. *动物学研究*, 1995, 16(2):146-152.

LAN Hong, WANG Wen, SHI Li-ming. PCR analysis of DNA from fur specimens of Muntjacs (*Muntiacus*) [J]. *Zool Res*, 1995, 16(2):146-152.

[13] SAMBROOK J, FRITISCH EF, MANIATIS T. *Molecular Cloning, A laboratory Manual* [M]. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989.

[14] STANLEY H F, KADWELL M, WHEELER J C. Molecular evolution of the family Camelidae: A mitochondrial DNA study[J]. *Proc R Soc Lond B*, 1994, 256(1345):1-6.

[15] ANDERSON S, BANKIER A T, BARRELL B G. Sequence and organization of the human mitochondrial genome[J]. *Nature*, 1981, 290(5806):457-465.

[16] KUMAR S, TAMURA K, NEI M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment [J]. *Briefings in Bioinformatics*, 2004, 5:150-163.

[17] HARRISON J A. Revision of the Camelidae (Artiodactyla, Tylopoda) and description of the new genus *Alforjas*[J]. *Palaeont Contr (University of Kansas)*, 1979, 95:1-27.

[18] LAVALLEE D, JULIEN M, WHEELER J C, et al. *Telarmachay Chasseurs et Pasteurs Prehistoriques es Andes 1*[M]. Paris: Editions Recherches sur les civilisations, ADPF, 1986:21-59.

[19] 宁夏农学院. 养骆驼[M]. 北京:农业出版社, 1990:2-5. Ningxia College of Agriculture. *Domestication of Camel*[M]. Beijing: Chinese Cultivation Agriculture Publishing, 1990:2-5.

[20] 中国地质科学院地质研究所武汉地质学院. *中国古地理图集*[M]. 北京:地图出版社, 1985:137-138. Wuhan College of Geology, Institute of Geology, Chinese Academy of Geological Sciences. *Atlas of the Palaeogeography of China* [M]. Beijing: Cartographic Publishing House, 1985:137-138.