

从细胞色素 *b* 基因序列差异分析神农架白熊的系统进化关系

王慧娟, 张志敏, 刘中来, 熊国梅

(华中师范大学生命科学学院遗传学实验室, 武汉 430079)

摘要: 神农架白熊的分类地位从它被发现后就一直存在着争议。文章测定了神农架白熊一个个体的 Cyt *b* 基因从 423~1 140 共 718 bp 的序列, 结合亚洲黑熊(*Selenarctos thibetanus*)、美洲黑熊(*Euarctos americanus*)、马来熊(*Helarctos malayanus*)、棕熊(*Ursus arctos*)、北极熊(*Thalarctos maritimus*)、懒熊(*Melursus ursinus*)、眼镜熊(*Tremarctos ornatus*)、大熊猫(*Ailuropoda melanoleuca*)、小熊猫(*Ailurus fulgens*)、浣熊(*Procyon lotor*)同源 DNA 序列进行比较, 分析了碱基组成频率、替代数、变异位点、简约信息位点数、转换/颠换比率、相似指数和分化指数。用邻接法(NJ)和最大节约法(MP)构建了分子系统树, 得到了基本相同的拓扑结构。结果显示, 神农架白熊与亚洲黑熊的亲缘关系最近, 与大熊猫的亲缘关系较远。

关键词: 神农架白熊; 细胞色素 *b*; 系统进化

中图分类号: Q751

文献标识码: A

文章编号: 0253-9772(2006)10-1237-05

A Molecular Phylogeny of Shennongjia White Bear Based on Mitochondrial Cytochrome *b* Gene Sequence

WANG Hui-Juan, ZHANG Zhi-Min, LIU Zhong-Lai, XIONG Guo-Mei

(Genetics Laboratory, College of Life Sciences, Central China Normal University, Wuhan 430079, China)

Abstract: The phylogenetic relationship of Shennongjia white bear has been an open question. Total DNA was extracted and sequenced from hair and feces of Shennongjia white bear. Based on the partial Cyt *b* gene sequence obtained from the samples, the authors aligned them using the Clustal W software program. The MEGA software was used to analyze the divergences and base substitutions of the partial Cyt *b* gene among the 11 species: Shennongjia white bear, *Selenarctos thibetanus*, *Euarctos americanus*, *Helarctos malayanus*, *Ursus arctos*, *Thalarctos maritimus*, *Melursus ursinus*, *Procyon lotor*, *Ailuropoda melanoleuca*, *Ailurus fulgens* and *Tremarctos ornatus*. The phylogenetic trees constructed by multiple methods (NJ and MP) supported nearly the same topology. Our molecular results show that the sequence divergence between Shennongjia white bear and Asiatic black bear (*Selenarctos thibetanus*) is lower than that between other species.

Key words: Shennongjia white bear; cytochrome *b*; phylogeny

作为遗传物质的DNA同时也是生物进化史的重要记录者, 在研究生物的进化过程、确定物种间的进化关系方面具有进化信息量大、易于分析以及容易获取的优势^[1]。在研究种间和种内进化关系和遗传多

样性来说, 快速进化的线粒体DNA已成为一个常用既有效的分子标记; 而细胞色素*b*基因(Cyt *b*)的结构和功能是在mtDNA的13个蛋白质编码基因中被研究的最为清楚, 因此, Cyt *b*成为研究种内或近缘种

收稿日期: 2006-02-22; 修回日期: 2006-05-15

作者简介: 王慧娟(1980-)女, 在读硕士, 专业方向: 分子遗传学。Email: judy_wong@163.com

通讯作者: 刘中来(1952-)男, 副教授, 研究方向: 分子遗传学。Email: liuzhonglai@yahoo.com.cn

致谢: 衷心感谢钟华博士以及黄耿清博士的无私指导, 并感谢武汉动物园的杜有训、杜美丽和胡龙等同志为本研究在取样上提供许多帮助。

间系统发育和遗传问题最常用的工具之一, 它的部分或全序列被广泛应用于动物类群的系统进化和分类研究中^[2,3]。

神农架白熊是我国神农架山地特有的珍稀动物, 从 1954 年来仅发现 10 只, 目前圈养的只有两只, 均为雄性, 其中一只在武汉动物园, 另一只在深圳野生动物园。自被发现以来, 神农架白熊的分类地位一直倍受争议, 目前主要有以下两种观点: 一部分人认为它是黑熊的白化型, 大多数人认为神农架白熊是远古残遗至今的一个独立的熊种。而目前关于神农架白熊, 仅有生活习性和外部形态的寥寥几篇报道, 对于神农架白熊的遗传分析及分类地位的研究仍是一片空白。因此, 我们通过对神农架白熊的 mtDNA 细胞色素 *b* 部分基因序列进行比较分析, 对神农架白熊的分类地位作初步的探讨。

1 材料和方法

1.1 实验材料

神农架白熊的毛发和粪便样品均取自武汉动物园。

1.2 样品的处理和基因组 DNA 的提取

毛发和粪便样品取回后置于 -20℃ 冰箱, 毛发 DNA 的提取按照 Higuchi R 等^[4]的方法进行, 粪便 DNA 的提取方法参见钟华等^[5]的方法。对于毛发和粪便 DNA 的提取分别进行。

1.3 PCR 扩增与序列测定

根据在 NCBI 上发表的大熊猫细胞色素 *b* 基因 (X94918) 设计引物: 上游引物(起始位点 423) 5'-AGGAGCAACCGTCATCAC-3', 下游引物(末位 946) 5'-TCATGCTTCGTTGTTTGG-3'。扩增在 PTC200 型 PCR 仪上进行, 采用 20 μL 反应体系, 每个反应 35 个循环, 每个循环包括 94℃ 变性 60 s, 53℃ 退火 60 s, 72℃ 延伸 60 s。首次循环前 94℃ 预变性 180 s, 最后一次循环后 72℃ 延伸 10 min。对于毛发和粪便 DNA 模板分别扩增, 且每次反应设立不含 DNA 模板的空白对照。扩增得到的 PCR 产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 然后将 PCR 产物纯化并克隆到 pGEM-T Vector 中(购自晶美生物), 鉴定阳性克隆后, 对阳性克隆进行测序, 测序工作由上海英骏生物公司完成。根据测序结果和 NCBI 上已经发表的哺乳动物线粒体 tRNA^{Thr} 分别设计第二个片段两端的引物, 引物序列分别为: 上游引物(起始位点 847) 5'-TCCATCCCCAACAACTAGG-3', 下游引物(tRNA^{Thr}) 5'-GGYTTACAAGACCARRGTAAT-3'。如上方法进行扩增并测序。

1.4 DNA 序列的数据处理

将两个片段进行拼接后, 先用 Clustal X 1.83 排定 DNA 序列, 并进行人工核查。在此基础上, 用 MEGA 3.0 计算不同序列间的碱基组成频率、变异位点、简约信息位点数、转换/颠换比率; 用 DNASTAR

表 1 神农架白熊及其他熊类的碱基组成频率(%)

Table 1 Frequencies of base composition in bears

	T	C	A	G	T1	C1	A1	G1	T2	C2	A2	G2	T3	C3	A3	G3
EA	25.2	32.0	28.3	14.8	15.0	38.3	39.2	7.5	18.8	31.4	25.9	23.8	41.8	26.4	19.7	12.1
ST	25.9	31.5	28.8	13.8	15.8	37.9	40.4	5.8	20.5	29.7	26.4	23.4	41.4	26.8	19.7	12.1
UA	26.7	30.4	28.4	14.5	19.6	33.8	39.2	7.5	18.8	31.0	26.4	23.8	41.8	26.4	19.7	12.1
AM	30.8	26.9	28.8	13.5	29.2	25.8	38.3	6.7	20.9	28.9	28.9	21.3	42.3	28.9	19.2	12.6
AF	29.0	29.0	29.7	12.4	23.8	32.9	37.9	5.4	19.7	29.3	31.4	19.7	43.5	24.7	19.7	12.1
HM	26.6	30.8	28.7	13.9	17.1	37.1	39.6	6.3	20.9	28.9	26.8	23.4	41.8	26.4	19.7	12.1
TM	26.3	30.9	28.3	14.5	17.9	35.4	38.8	7.9	18.8	31.4	26.4	23.4	42.3	25.9	19.7	12.1
PL	28.7	28.0	31.1	12.3	20.4	32.9	42.1	4.6	20.9	28.0	30.5	20.5	44.8	23.0	20.5	11.7
MU	26.0	30.9	28.8	14.2	15.8	37.5	39.2	7.5	19.7	29.7	27.6	23.0	42.7	25.5	19.7	12.1
TO	28.0	29.7	28.4	13.9	20.0	35.0	38.8	6.3	20.9	28.9	26.8	23.4	43.1	25.1	19.7	12.1
WB	24.5	32.7	28.7	14.1	14.2	39.6	40.0	6.3	18.4	31.4	26.4	23.8	41.0	27.2	19.7	12.1
Avg.	27.1	30.2	28.9	13.8	19.0	35.1	39.4	6.5	19.9	29.9	27.6	22.7	42.4	25.8	19.7	12.1

EA: 美洲黑熊; ST: 亚洲黑熊; UA: 棕熊; AM: 大熊猫; AF: 小熊猫; HM: 马来熊; TM: 北极熊; PL: 浣熊; MU: 懒熊; TO: 眼镜熊; WB: 神农架白熊(简称下同)。

EA: *Euarctos americanus*; ST: *Selenarctos thibetanus*; UA: *Ursus arctos*; AM: *Ailuropoda melanoleuca*; AF: *Ailurus fulgens*; HM: *Hellarctos malayanus*; TM: *Thalarctos maritimus*; PL: *Procyon lotor*; MU: *Melursus ursinus*; TO: *Tremarctos ornatus*; WB: Shennongjia white bear.

软件分析相似指数和分化指数; 用 MEGA 软件基于 Kimura 2-parameter 距离采用 NJ 法和 MP 法构建分子系统树。系统树各分支的置信度由 1 000 次自举法 (bootstrap) 重复检测。

2 结 果

2.1 细胞色素 *b* 基因序列及其变异

毛发和粪便 DNA 分别扩增测序后, 测序的结果证明毛发 DNA 与粪便 DNA 对应的两个片段序列是一致的, 因此可以证明我们所得到的 DNA 是白熊的。我们将获得的两个细胞色素 *b* 基因片段, 拼接到线粒体细胞色素 *b* 从 423 到 1 140 共 718 bp 的片段。我们的结果表明: (1) 每个片段的 PCR 扩增总是产生大小相同的一条带, 没有其他条带的影响, 并且阴性对照无条带; (2) 经序列核对和氨基酸转换, 没有缺失、插入和终止密码子出现。因此, 我们所得到的序列是线粒体序列, 而非核中线粒体假基因的干扰。在研究的所有细胞色素 *b* 基因序列中, 共有 296 个位点呈现变异, 其中 191 个简约信息位点; A、T、C、G 碱基的平均含量分别 28.9、27.1、30.2、13.8, 碱基组成的百分比中显示出了 G 的相对缺乏。核苷酸的变异差异也存在很大的差异, 所有统计的熊类 718 bp 的序列中, 平均发生碱基转换 88 个, 颠换 22 个, 其转换/颠换比为 4.1, 而第一位碱基的转换和颠换分别为 63 和 19, 其比值为 3.2; 第二位碱基的转换和颠换分别为 17 和 2, 其比值为 8.1; 第三位转换和颠换分别为 8 和 0, 其比值为 43.0。这说明核苷酸的

替换主要以转换为主, 转换多于颠换, 表现出高的偏倚性(Bias)。

2.2 分子系统树的构建

基于我们的序列数据与从 GenBank 中检索获得的亚洲黑熊(Asiatic black bear, *Selenarctos thibetanus*, GenBank 号: AB020910)、美洲黑熊(American black bear, *Euarctos americanus*, GenBank 号为 U23556)、大熊猫(Giant panda, *Ailuropoda melanoleuca*, GenBank 号为 AY390359)、小熊猫(lesser panda, *Ailurus fulgens*, GenBank 号: X94919)、马来熊(Malayan sun bear, *Helarctos malayanus*, GenBank 号: U18899)、北极熊(polar bear, *Thalarctos maritimus*, GenBank 号: X82309)、棕熊(brown bear, *Ursus arctos*, GenBank 号为 AB020909)、懒熊(sloth bear, *Melursus ursinus*, GenBank 号: U23562)、眼镜熊(spectacled bear, *Tremarctos ornatus*, GenBank 号: U23554)、浣熊(raccoon, *Procyon lotor*, GenBank 号: X94930)的细胞色素 *b* 基因相应的基因序列一起进行系统发育分析。基于 Kimura 两参数(2-parameter)距离采用邻接(NJ)法(图 1: A)以及采用简约(MP)法(图 1: B)来构建分子树。所有系统树支上数值为 1 000 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, 神农架白熊先和亚洲黑熊聚为一类, 然后和美洲黑熊聚合。这两个系统树中, 只是马来熊和大熊猫的位置不同, 其他均一样。

表 2 熊类不同动物细胞色素 *b* 基因序列的距离

Table 2 The pair distances of bears by J. Hein (Weighted) for cytochrome *b* nucleotide sequences

	EA	ST	UA	AM	AF	HM	TM	PL	MU	TO	WB
EA		90.8	87.8	80.9	81.2	88.9	88.3	77.7	89.0	83.9	91.7
ST	10.1		90.0	82.3	79.7	89.6	90.7	78.4	89.6	84.7	95.3
UA	14.0	11.1		83.7	81.5	90.3	98.1	76.4	90.8	85.3	90.8
AM	23.3	21.2	19.2		79.6	83.0	82.6	75.9	81.8	82.5	83.0
AF	22.2	24.6	21.9	24.7		80.0	81.5	79.3	80.9	78.9	80.5
HM	12.5	11.7	10.8	20.2	24.2		91.1	77.6	89.3	84.8	90.7
TM	13.2	10.3	2.0	20.8	21.9	9.8		77.1	91.4	85.1	91.1
PL	27.2	26.1	29.5	30.2	24.8	27.5	28.3		77.7	75.9	78.6
MU	12.3	11.6	10.1	22.0	22.7	12.0	9.4	27.2		87.1	90.7
TO	18.9	17.8	17.1	21.0	25.8	17.6	17.2	30.0	14.6		85.0
WB	9.1	5.0	10.1	20.2	23.3	10.3	9.8	25.9	10.3	17.4	

注: 对角线上表示相似指数, 对角线下表示分化指数。

Note: Percent similarity in upper triangle and percent divergence in lower triangle.

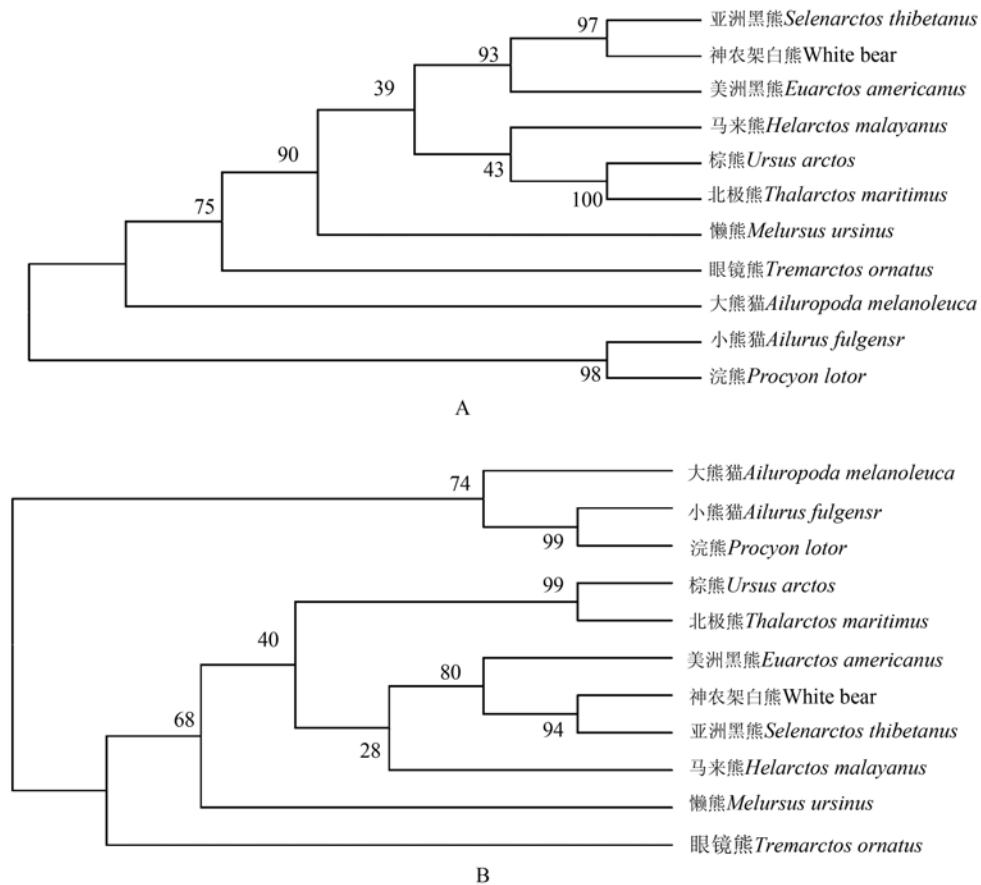


图 1 基于 *Cyt b* 基因序列构建的分子系统树(重复次数为 1 000 次)

图中数字为自举置信水平(BCL)值; A: NJ 树; B: MP 树。

Fig. 1 Molecular phylogenetic trees based on cytochrome b sequences data with Bootstrap Test (1 000 replications)

The values of bootstrap confidence level(BCL)of nodes are indicated above the branch.; A: NJ tree; B: MP tree.

3 讨论

3.1 线粒体 *Cyt b* 基因序列分析

在哺乳动物的mtDNA碱基替换中存在转换偏倚性,随着进化时间增加,颠换的累积,转换偏倚会下降^[6,7]。在我们所研究的 11 个物种中,转换/颠换比值平均为 4.1,最低为 3.2,最高为 43.0,数值均大于转换颠换比的临界值 2.0^[8],这说明了大熊猫、小熊猫、亚洲黑熊、美洲黑熊、棕熊等的线粒体 *Cyt b* 基因序列的突变可能没有达到饱和状态,随着遗传差异的增加,转换趋于饱和。

3.2 分子系统树

由图1可以看出,神农架白熊都是首先和亚洲黑熊汇聚,然后是和美洲黑熊。图 1: A 和图 1: B 在有关马来熊和大熊猫的位置上有冲突:图 1: A 显示马

来熊与棕熊和北极熊的亲缘关系近,并且所有熊类汇聚后再与大熊猫聚合;而图 1: B 则显示马来熊与神农架白熊、亚洲黑熊、美洲黑熊亲缘关系较近,并且大熊猫与浣熊、小熊猫的亲缘关系较与熊类的关系更紧密。无论哪种情况,我们的结果都显示神农架白熊与亚洲黑熊的亲缘关系最近。

我们的NJ树和张亚平等^[9]的熊超科 *Cyt b* 分子系统树基本一致,只是马来熊的位置有所不同:在张的NJ树中,马来熊与美洲黑熊先汇聚,再与棕熊、北极熊聚合,而我们所得的结果显示马来熊与棕熊、北极熊的亲缘关系更近。这可能是由于个体差异或者分子变异加权值不同所造成的。

3.3 神农架白熊的分子进化关系

从形态上来看,神农架白熊与亚洲黑熊有很多相类似的地方,因而有些人认为神农架白熊是亚洲

黑熊的白化型。但是二者形态上的区别也很显著: 神农架白熊年幼时毛色呈纯白色, 成年后变成黄白色或浅黄色, 而亚洲黑熊毛色为黑色; 神农架白熊的鼻子为肉红色, 眼睛为淡红色, 黑熊鼻子为黑色, 眼睛为黑褐色; 白熊的脚底板和脚爪周围伸出很长的白毛, 而黑熊则没有; 白熊脸短, 黑熊脸长; 白熊耳较圆, 黑熊而狭长; 白熊机灵活泼, 性情温驯, 黑熊迟缓笨拙, 性情粗暴。并且神农架白熊主食植物, 尤其是竹笋, 饥饿时偶尔吃昆虫和小动物, 而且会用细竹枝编睡窝。因而有些专家认为神农架白熊是从亚洲黑熊中突变出来的, 已不是一个变种, 而是一个独立的种^[10]。甚至有些专家认为它更像大熊猫, 是地球上与大熊猫最相似的动物。

根据我们的实验结果, 从线粒体细胞色素 *b* 基因的分子系统树来看, 神农架白熊与亚洲黑熊的亲缘关系最近, 与大熊猫的关系相对较远, 这为神农架白熊是亚洲黑熊的白化型或者是亚洲黑熊的变种甚至是从亚洲黑熊中突变出来的一个独立的熊种这几种说法提供了分子依据, 而不支持神农架白熊更像大熊猫的说法。至于神农架白熊到底是亚洲黑熊的白化型, 还是亚洲黑熊的变种, 或者是一个独立的熊种, 这还需要进一步的研究。

参 考 文 献 (References):

- [1] ZHANG Ya-Ping. DNA sequence and species tree. *Zoological Research*, 1996, 17(3): 247~252.
张亚平. 从 DNA 到物种树. *动物学研究*, 1996, 17(3): 247~252.
- [2] ZHOU Ji-Liang, ZHANG Ya-Ping, HUANG Mei-Hua, CHEN Yong-Jiu, CHEN Xiao-Qing, YAO Geng-Dong. Phylogenetic relationships among Crotalinae based on mitochondrial cytochrome *b* gene sequence variations. *Acta Zoologica Sinica*, 2001, 47(4): 361~366.
周继亮, 张亚平, 黄美华, 陈永久, 陈小青, 姚耿东. 蝮亚科蛇线粒体细胞色素 *b* 基因序列分析及其系统发育. *动物学报*, 2001, 47(4): 361~366.
- [3] 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. *Mol Biol Evol*, 1993, 10: 1196~1214.
- [4] Higuchi R, Beroldingen C H, Sensabaugh G F, Erlich H A. DNA typing from single hair. *Nature*, 1988, 322: 543~546. [\[DOI\]](#)
- [5] ZHONG Hua, LAI Xu-Long, WEI Rong-Ping, LIU Zhong-Lai. An improved protocol for DNA extraction from the feces of the giant panda. *Acta Zoologica Sinica*, 2003, 49(5): 670~674.
钟 华, 赖旭龙, 魏荣平, 刘中来. 一种从大熊猫粪便中提取 DNA 的改进方法. *动物学报*, 2003, 49(5): 670~674.
- [6] Hedges S B, Bezy R L, Maxson L R. Phylogenetic relationships and biogeography of Xantuslid lizards, inferred from mitochondrial DNA sequences. *Mol Bio Evol*, 1991, 8: 767~780.
- [7] Zhang Y P, Ryder O A. Mitochondrial DNA sequence evolution in the Arctoidea. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90: 9557~9561. [\[DOI\]](#)
- [8] Knight A, Mindell D P. Substitutions bias, weighting of DNA sequence evolution, and the phylogenetic positions of fea's viper. *Syst Biol*, 1993, 42(1): 18~31. [\[DOI\]](#)
- [9] ZHANG Ya-Ping, Oliver Ryder A. Molecular phylogeny of the Superfamily Arctoidea. *Acta Genetica Sinica*, 1997, 24(1): 15~22.
张亚平, Oliver Ryder A. 熊超科的分子系统发生研究. *遗传学报*, 1997, 24(1): 15~22.
- [10] YIN Ben-Shun, HUANG Xian-Da. Shennongjia white bear. *Wild Animal*, 1999, 20(1): 1.
尹本顺, 黄显达. 神农架白熊. *野生动物*, 1999, 20(1): 1.