

羚牛线粒体 DNA 和系统进化研究

高德贵,王平忠,阎小毅,蒙世杰

(西北大学 生命科学学院,陕西 西安 710069)

摘要:用 8 种限制酶分析了 5 种牛科动物,羚牛、黄牛、水牛、绵羊和山羊的线粒体 DNA 的多态性。依据数学模型计算这 5 种动物间的遗传距离,在此基础上构建了 UPG 和 NJ 两种分子系统进化树。结果表明:羚牛与牛和羊的分化时间分别为 4.02 Ma 和 3.72 Ma,因此将羚牛归入羊亚科较为合理。

关键词:羚牛;线粒体 DNA;多态性;系统进化

中图分类号:Q349.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-274 X (2003)02-0226-03

羚牛(*Budorcas taxicolor*)是一种似牛非牛、似羊非羊,出没于高山峻岭之间,颇为神秘的大型珍兽,属我国一类保护动物。国际 IUCN 组织将它列为珍稀级(rare)。然而,羚牛似牛似羊的形态结构特征,使传统形态分类的方法难以得出确定的结论。因此,关于羚牛分类地位的争论已长达 100 多年,至今没有定论^[1]。正如 Geist 所指出的^[2]:偶蹄类的比较形态学在分类上及进化研究中不总是有意义的,因为这些动物的形态学特征随环境变化呈现出很大的差异,单凭这些分析物种的亲缘关系远远不够。

线粒体 DNA(mtDNA)具有进化速度快、多态性丰富和严格的母性遗传特点。近年来,mtDNA 的多态性分析已成为重建生物进化史和提供分类证据的有效手段^[3]。本研究用 8 种限制酶分析了 5 种牛科动物 mtDNA 的限制性片段长度多态性(Restriction Fragment Length Polymorphism,RFLP),旨在为羚牛的进化及分类地位提供 DNA 水平的证据。

1 材料和方法

1.1 材料

用于提取 mtDNA 的材料为动物的肝脏或肾脏,其来源见表 1。

1.2 mtDNA 的制备

按王文等的方法^[4],略加修改制备 mtDNA。

表 1 实验动物样品来源

Tab. 1 Resource of animals used in the study

动物种	数量	性别	组织	来源
羚牛	1	♂	肝脏	佛坪县
黄牛	4	♀	肝脏	宝鸡县
水牛	2	♂	肝脏	西乡县
绵羊	1	♂	肾脏	定边县
山羊	5	2♂	肝脏	宝鸡县

1.3 酶切和电泳

酶切反应总体积 20 μL ,含 2 μL 的缓冲液,1 μg 的 mtDNA,2~3 倍过量限制性酶,37 $^{\circ}\text{C}$ 保温 4~6 h,然后 65 $^{\circ}\text{C}$,10 min 以终止反应。

0.8% 琼脂糖凝胶,电泳缓冲液为 TPE (0.08 mol/L Tris-磷酸,0.002 mol/L EDTA),3~4 V/cm 电压,室温电泳 4 h,用 0.51 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的溴化乙锭(ethidium bromide,EB)染色,然后观察、拍照。

1.4 数据处理

用已知标准分子质量的 DNA 片段为对照,根据 DNA 分子泳动距离与分子质量的对数成反比,来估计各酶切片段的分子质量。

种间遗传距离的估算,采用文献[5]的模型:

$$F = 2Nxy / (Nx + Ny),$$

$$P = 1 - \{[(F^2 + 8F)^{1/2} - F] / 2\}^{1/r}.$$

收稿日期:2001-11-23

基金项目:中国科学院核心资助项目(97-04-20)

作者简介:高德贵(1965-),男,陕西米脂人,西北大学硕士生,从事动物遗传学研究。

式中: F 为两物种间共享片段的期望比例, N_x 和 N_y 分别为物种 x 和 y 的限制片段数; N_{xy} 为两物种共享片段数; r 为限制酶识别序列的碱基对数, 本实验中 $r=6$ 。根据上式计算的 P 值(遗传距离)用 UPG 法和 NJ 法构建系统进化树。

2 结 果

用 8 种限制酶对 5 种动物, 15 个个体的 mtDNA 酶切结果见表 2。

表 2 5 种动物 mtDNA 酶切片段及分子量

Tab. 2 Molecular Weights of restriction fragments of mtDNA from five species 单位/Kb

动物种	Pst I	Hind III	BamH I	EcoR I	Xba I	Xho I	EcoR V	Sac I
羚牛	16.4	9.6 6.8	7.6 1.4 4.4 1.4	9.4 7.0	6.6 6.2 16.4 16.4	16.4	16.4	16.4
黄牛	9.4 7.0 16.4		11.3 2.0 3.1	7.0 4.2 5.1	16.4	16.4 16.4	16.4	16.4
水牛	16.4	9.4 7.0	11.4 1.8 3.4	5.6 4.2 4.5	10.2 2.0 16.4 16.4	16.4	16.4	16.4
绵羊	16.4	14.3 0.4 1.7	10.6 1.4 4.4	10.7 2.7 3.0	16.4	16.4 9.4 7.0	16.4	16.4
山羊	16.4	10.0 6.4	6.6 3.6 5.0 1.2	16.4	16.4	16.4 16.4	16.4	16.4

分子量测定结果表明: 5 种动物的 mtDNA 分子量为 16.4 kb, 其中羚牛为首次报道。各物种的酶切片段数、种间共享片段数比例和种间遗传距离列于表 3。

表 3 各物种的酶切片段数(对角线)、种间共享片段数比例(对角线下)和种间遗传距离(对角线上)

Tab. 3 Fragment numbers within a species (on the diagonal), Proportion of shared fragments (below the diagonal) and genetic distance (above the diagonal)

动物种	羚牛	黄牛	水牛	绵羊	山羊
羚牛	16	0.077 2	0.083 4	0.067 4	0.081 4
黄牛	0.257 9	13	0.077 2	0.093 1	0.062 1
水牛	0.250 0	0.275 9	16	0.095 4	0.067 4
绵羊	0.326 6	0.214 3	0.193 5	15	0.065 4
山羊	0.258 1	0.357 1	0.326 6	0.333 3	15

根据种间遗传距离, 采用 UPG 法和 NJ 法构建

两种分子系统进化树(见图 1)。

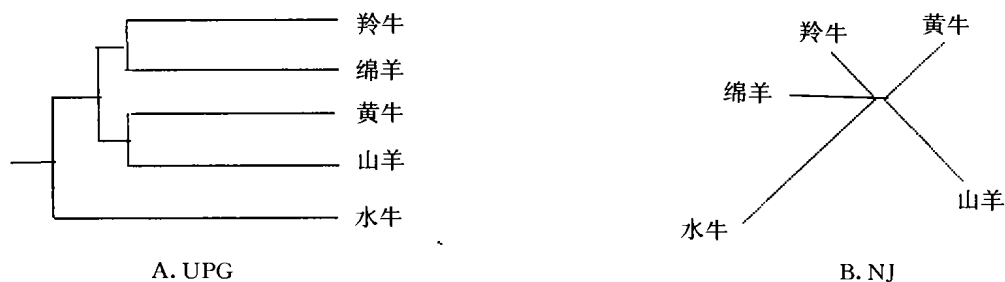


图 1 采用 UPG 法和 NJ 法构建的两种分子系统进化树

Fig. 1 MtDNA phylogenetic trees constructed with UPG method(A) and NJ method(B)

3 讨 论

从表 3 可知, 羚牛与两种牛的平均遗传距离为 0.080 3 [= (0.077 2 + 0.083 4) / 2], 而与两种羊的

平均遗传距离为 0.074 4 [= (0.067 4 + 0.081 4) / 2], 表明羚牛与羊之间的亲缘关系比牛更近。从所构建的两种分子系统树中也可以发现, 羚牛与绵羊的关系最近, 与水牛的关系最远。然而, 羚牛与山羊的遗传距离却大于与黄牛的遗传距离, 这正好支持了

牛科动物在系统发育进化过程中,羚牛是牛和羊之间的过渡类型的观点^[6]。

在本研究中,未发现种内遗传差异,这很可能是由于样本太小和取样地点单一的缘故。

按哺乳动物 mtDNA 的进化速率每百万年约为 2.0% 计算^[7],羚牛与绵羊、黄牛、山羊和水牛间的分化时年依次为 337,386,407 和 417 万年前,处于上新世和更新世之间。这与所发现的羚牛、牛和羊的化石年代基本一致,也与牛科动物起源于中新世,在上新世和更新世产生了许多分歧的观点相一致^[8]。

羚牛究竟属于麝牛亚科(*Ovibos moschatu*)、岩羚羊亚科(*Rupicaprinae*)、羚羊亚科(*Antilopinae*),还是羊亚科(*Caprinae*),历来意见不一^[1]。吴家炎将牛科各亚科一些代表物种的外形和头骨加以比较,将其归入麝牛亚科^[9]。众所周知,物种形态结构上的差异最终是由 DNA 分子的差异所引起的。对偶蹄类 mtDNA 细胞色素 b 基因序列变异的研究^[10]与本研究结果一致,表明羚牛与羊的亲缘关系近于牛;染色体核型分析和 LDH 血清同工酶分析^[9]也证明羚牛更接近羊类;结合形态结构介于牛和羊之间,但更近于羊^[9],我们认为羚牛隶属于羊亚科较为合理。然而,我们的研究并未包括麝牛和岩羚羊等动物,所以不能排除其他学者的观点。显然,对此问题的解决尚需更大范围的研究。

本文通讯作者:蒙世杰教授。

参考文献:

[1] 吴家炎. 中国羚牛[M]. 北京:中国林业出版社,1987.

5-55.

- [2] GEIST V. Endangered species and the law[J]. Nature, 1992, 357: 274-276.
- [3] MEYER A, KOCHER T D, BASASIBWAKIP, et al. Monophyletic origin of Lake Victoria Cichlid fishes suggested by mitochondrial DNA Sequences[J]. Nature, 1990, 347: 550-553.
- [4] 王文, 施立民. 一种改进的动物 mtDNA 的提取方法[J]. 动物学研究, 1993, 14(2): 197-198.
- [5] NEI M, LI W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonuclease[J]. PNAS SUA, 1979, 76: 5 269-5 273.
- [6] 陈宣峰, 郭健民. 哺乳动物染色体[M]. 北京: 科学出版社, 1986. 184-192.
- [7] BWOWN W M. Evolution of animal mtDNA. Evolution of gene and proteins[A]. Nei M, Koehn, K K, eds. Sinauer Associates[C]. Sunderland, MA, 1983. 62-68.
- [8] COLBERT E H. Evolution of vertebrate (in chinese) [M]. Beijing: Geological Press, 1955.
- [9] 吴家炎. 中国羚牛分类、分布的研究[J]. 动物学研究, 1986, 7(2): 167-174.
- [10] 蒙世杰, 王 静. 羚牛细胞色素 b 基因序列分析和系统进化研究[J]. 西北大学学报(自然科学版), 2001, 31(4): 347-350.

(编辑 徐象平)

Mitochondrial DNA of takin and its phylogeny

GAO De-gui, WANG Ping-zhong, YAN Xiao-yi, MENG Shi-jie

(College of Life Science, Northwest University, Xi'an 710069, China)

Abstract: Eight restriction endonucleases were used to investigate mitochondrial DNA polymorphisms of takin, cattle, sheep, buffalo and goat in Bovidae. The genetic distances between the five species were calculated with Nei and Li's mathematical model. Based on the data of genetic distances, the phylogenetic evolution trees were constructed using UPG method and NJ method. The results showed that the divergent times between takin and ox, and between takin and sheep were 4.02 Ma and 3.72 Ma respectively, and it seemed reasonable to put takin in Caprinae.

Key words: takin; mitochondrial DNA; polymorphism; phylogeny