



基于线粒体基因的新疆三种野兔分类及遗传多样性

单文娟*, 代慧英, 张玉琮

(新疆大学生命科学与技术学院, 新疆生物资源基因工程重点实验室, 乌鲁木齐 830046)

摘要: 旨在利用分子遗传学方法探讨新疆3种野兔的系统发育关系和遗传多样性, 以期明确其亲缘关系和分类地位, 并评估其遗传多样性水平, 为后续新疆野兔乃至中国野兔的保护遗传学等研究提供基础数据。本研究选用线粒体DNA的COI、ND4、16S rRNA 3个基因为分子标记, 通过PCR扩增及测序技术分别测定采自新疆8个地区、4个地理组群共计57例野兔组织样本的3个基因序列, 将序列校正拼接后用MEGA 7、DNAsp 6、Arlequin 3.1、MrBayes 3.2等软件进行数据分析。结果表明, 将57例野兔样本的3个基因序列合并后共检测到43种单倍型, 系统发育和中介网络图将相同及相邻地区的野兔划分为5个支系(Clade A-E)3大枝, 且3大枝之间的遗传距离(4.21%~9.09%)均达到种间距离水平; 其中, 第3大枝中来自中部地区的野兔(Clade D)和新疆北部野兔(Clade E)的亲缘关系较近, 二者之间的遗传距离 $\leq 2.26\%$, 未达到种间遗传距离水平。新疆3种野兔中塔里木兔、藏兔帕米尔亚种和托氏兔西域亚种的单倍型多样性(h)较高, 分别为 0.979 ± 0.014 、 0.972 ± 0.064 和 0.972 ± 0.064 , 而托氏兔西域亚种和中亚亚种的核苷酸多样性(π)较高, 分别为 0.033 ± 0.018 和 0.023 ± 0.015 。基于线粒体3个基因的综合分析结果, 结合已报道文献, 本研究认为来自新疆西南部帕米尔高原的野兔应属于藏兔帕米尔亚种, 支持将来自新疆北部阿勒泰及中部达坂城和托克逊地区的野兔分别划分为托氏兔西域亚种和托氏兔中亚亚种。新疆3种野兔具有丰富的遗传多样性和较明显的系统地理分布格局。

关键词: 新疆兔属动物; 分类; 遗传多样性; 系统发育; mtDNA

中图分类号: S813.1; S829.1

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2020)10-2403-10

Classification and Genetic Diversity of Three Hare Species in Xinjiang Based on Mitochondrial DNA

SHAN Wenjuan*, DAI Huiying, ZHANG Yucong

(Xinjiang Key Laboratory of Biological Resources and Genetic Engineering,

College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830046, China)

Abstract: The study aimed to explore the phylogeny and genetic diversity of 3 hare species in Xinjiang by molecular genetics methods, define the relationship and taxonomy status, assess diversity level of *Lepus* in Xinjiang, and provide the basic data for conservation genetics of hares in Xinjiang and even in China. Three mitochondrial DNA genes, COI, ND4 and 16S rRNA, were used as molecular markers, and the sequences of 3 genes of 57 samples collected from 8 different regions (4 geographic groups) in Xinjiang were determined by PCR amplification and sequencing technology. After the sequences of COI, ND4 and 16S rRNA of each sample were revised and pooled together, data were analyzed with softwares such as MEGA 7, DNAsp 6, Arlequin 3.1

收稿日期: 2020-03-14

基金项目: 国家自然科学基金(31860599; 31301006)

作者简介: 单文娟(1979-), 女, 回族, 新疆哈密人, 博士, 主要从事野生动物保护与分子遗传学研究, E-mail: wenjuanshan@sina.com; 代慧英(1994-), 女, 青海湟中人, 硕士生, 主要从事分子遗传学研究, E-mail: 1350470377@qq.com。单文娟和代慧英为同等贡献作者

* 通信作者: 单文娟, 主要从事野生动物保护与分子遗传学研究, E-mail: wenjuanshan@sina.com

and MrBayes 3.2. A total of 43 haplotypes were detected from the combined sequences of 3 genes of 57 hare samples. Five distinct clades (A-E) and 3 clusters were clearly showed in phylogenetic tree and median-joining network (MJN). Furthermore, the genetic distance between 3 clusters reached the level of species (4.21%-9.09%). However, the genetic distance between hares from northern Xinjiang (Clade E) and those from central Xinjiang (Clade D) were not up to the level of species ($\leq 2.26\%$) in the third cluster. The haplotype diversity (h) of *Lepus yarkandensis*, *Lepus tibetanus pamirensis* and *Lepus tolai lehmanni* were higher (0.979 ± 0.014 , 0.972 ± 0.064 and 0.972 ± 0.064 , respectively), while the nucleotide diversity (π) of the *L. t. lehmanni* and *L. t. centrasiaticus* were higher (0.033 ± 0.018 and 0.023 ± 0.015 , respectively). Based on comprehensive analysis of 3 genes of mitochondrion and reference with published research, it is suggested that hares from southwestern Pamir Plateau of Xinjiang should belong to *L. t. pamirensis*. Meanwhile, hares distributed in northern and central Xinjiang might be considered as *L. t. lehmanni* and *L. t. centrasiaticus*. Moreover, there is abundant genetic diversity in the 3 hare species in Xinjiang, and the obvious phylogeographic pattern is showed.

Key words: *Lepus* in Xinjiang; classification; genetic diversity; phylogeny; mtDNA

* **Corresponding author:** SHAN Wenjuan, E-mail: wenjuanshan@sina.com

兔属 (*Lepus*) 隶属于哺乳纲 (Mammalia)、兔形目 (Lagomorpha)、兔科 (Leporidae), 中国广泛分布有 8~10 个种, 可分为 22~24 个亚种^[1-2]。兔属动物作为一种常见的陆栖哺乳动物, 种类繁多, 是生态系统中重要的生物物种之一, 主要以草本植物为食, 其皮毛和野生兔肉还具有一定的经济价值, 因此对林业和畜牧农业发展有一定的影响。但是由于兔属动物分布范围广, 形态特征差异甚微, 尤其亚种之间形态极其相似, 且各兔属间存在杂交现象, 导致其分类十分困难。目前, 对于新疆藏兔 (*Lepus tibetanus*) 和托氏兔 (*Lepus tolai*) 的分类及其亲缘关系问题存在较大争议, 无论是传统形态学还是分子生物学的分类研究都尚未形成统一的结论^[3-4]。罗泽琦^[5]根据兔属动物的外部形态特征、头骨计量学以及地理分布等研究认为, 新疆分布有雪兔 (*Lepus timidus*)、塔里木兔 (*Lepus yarkandensis*) 和草兔 (*Lepus capensis*), 其中雪兔分为雪兔指名亚种 (*Lepus timidus timidus*) 和雪兔鲜卑亚种 (*Lepus timidus sibiricorum*) 2 个亚种; 塔里木兔为新疆特有物种, 分类较为明确, 且目前未出现分化^[6]; 草兔分为草兔西域亚种 (*Lepus capensis lehmanni*)、草兔中亚亚种 (*Lepus capensis centrasiaticus*) 和草兔帕米尔亚种 (*Lepus capensis pamirensis*)。但近年来, 对“草兔”的命名及其各亚种划分一直存在分歧, 普遍认为我国“草兔”并非草兔, 应将其命名为托氏兔或蒙古兔^[7]; 王应祥^[8]则认为, 分布于新疆西北部

地区的野兔为托氏兔西域亚种 (*Lepus tolai lehmanni*), 分布在新疆西南帕米尔高原地区的野兔为藏兔帕米尔亚种 (*Lepus tibetanus pamirensis*); 然而, Andrew 和 Yan^[9]根据相关研究, 进一步将分布于新疆中东部地区的野兔划分为藏兔中亚亚种 (*Lepus tibetanus centrasiaticus*); 但是程承等^[10]和 Wu 等^[11]的研究又从形态和分子学两方面将其归属为托氏兔的一个亚种。关于新疆野兔遗传多样性方面的研究, 基于线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 标记的塔里木兔遗传多样性报道较多^[12-14], 然而由于分类和分布尚不明确, 对新疆其它野兔此方面的研究几乎未见报道。

目前, 对于新疆多样生境下的野兔分类及分布情况尚不明确, 且新疆部分野兔的遗传多样性研究较少, 因此, 本研究采用动物常用的 3 个线粒体标记^[15-16] (16S rRNA、COI、ND4) 来分析新疆野兔的系统发育关系和遗传多样性水平, 从线粒体水平初步探讨争议较大的藏兔及托氏兔的分类地位, 为新疆乃至中国野兔的多样性研究提供分子遗传学方面的科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本研究收集了新疆 3 种野兔的样本共计 57 例, 分别采自新疆 8 个地区 (县市, 表 1), 为方便分析, 根据样本的形态特征和地理分布, 参考已发表的野

兔分子和形态学方面的分类结果^[6,11,17]将其进行分组,共分为西南部帕米尔高原地区、南部塔里木盆地周围地区、中部地区和北部地区 4 个地理组群,见表 1。其中,南部塔里木盆地周围地区的野兔为我国特有种塔里木兔,其分类状况较为明确,但为便于后续与新疆其他野兔分类地位的比较分析,统一采用以

地点分组来命名。同时从 GenBank 数据库中下载了已发表的其它兔属物种的 mtDNA 基因组全序列共计 6 条,分别为 *L. capensis*(KJ397612)、*L. tolai*(KM609214)、*L. t. pamirensis*(MN539746)、*Lepus europaeus* (AJ421471)、*Lepus hainanus*(JQ219662)、*Lepus americanus*(KJ397613)。

表 1 新疆野兔样本采集信息

Table 1 The detailed information of hare samples in Xinjiang

分组 Group	样本数量 Number of samples	具体采样地 Sampling site	分类情况 Classification
北部种群 Northern group	9	阿勒泰地区(ALT)	藏兔西域亚种? /托氏兔西域亚种?
中部种群 The central group	4	托克逊县(TKX)	藏兔中亚亚种?
	7	达坂城县(DBC)	/托氏兔中亚亚种?
西南部帕米尔高原种群 Southwest Pamir Plateau group	9	帕米尔高原地区:塔什库尔干县(TX),阿克陶县(AKT), 乌恰县(WQ)	藏兔帕米尔亚种?
南部塔里木盆地周围种群 Around of southern Tarim Basin group	13	帕米尔高原周边地区(同上)	塔里木兔
	7	阿克苏地区(AKS)	
	8	库尔勒市(KRL)	

“?”为分类不明确

“?” means that the classification is unclear

1.2 基因组 DNA 提取、PCR 扩增

采用经典的苯酚-氯仿法^[18]提取总 DNA,对质量较好的 DNA 提取产物进行 PCR 扩增,分别扩增 *COI*、*ND4*、*16S rRNA* 基因。根据 GenBank 上雪兔(NC_024040)、草兔(NC_015841)、托氏兔(NC_025748)、藏兔(LC_073697)、塔里木兔(MG_279351)的线粒体基因组序列,利用 Oligo v1.756 软件分别设计 3 个基因的引物序列,并送生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

3 个不同分子标记的引物序列及其各自 PCR 扩增条件见表 2。*COI*、*ND4*、*16S rRNA* 基因的 PCR 扩增体系均为:Premix Taq (1.25 U · 25 μL^{-1}) 13 μL , DNA 模板 1 μL , 上、下游引物 (10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 各 1 μL , 无菌去离子水 9 μL 。将 PCR 扩增产物进行 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测,并回收产物进行测序。

1.3 数据分析

将 3 个基因的序列测序结果用 MEGA 7 分别进行多重序列比对,并手工校正后用 Sequence Matrix Windows 1.8 拼接合并,然后利用 DNAsp 6 和 MEGA 7 分析序列特征及遗传距离,用 Arlequin

3.1 软件计算单倍型多样性(haplotype diversity, h)、核苷酸多样性(nucleotide diversity, π)、群体间的 Tajima's D 和 Fu's F_s 值,采用 MEGA 7 和 MrBayes 3.2.6 分别以邻接法(neighbor-joining, NJ)和贝叶斯法(Bayesian inferences, BI)构建系统发育树。最后用 Network 4.1.1.2 软件构建群体中介网络图(median-joining network)。

2 结果

2.1 基因组 DNA 提取与 PCR 扩增

野兔肌肉组织中提取基因组 DNA,以此为模板对 mtDNA 3 个基因片段进行 PCR 扩增,由图 1 可见,电泳检测得到与预期目标片段大小一致的清晰条带,可进一步用于测序分析。

2.2 合并序列特征分析

将 3 个分子标记的基因序列拼接,获得 57 条总长为 1 610 bp 的序列,经分析其中 T、C、A、G 碱基平均含量分别为 31.4%、23.9%、29.2%和 15.5%, T + A 含量 (60.6%) 明显大于 C + G 含量 (39.4%),存在 A/T 偏倚性,即符合哺乳动物线粒体

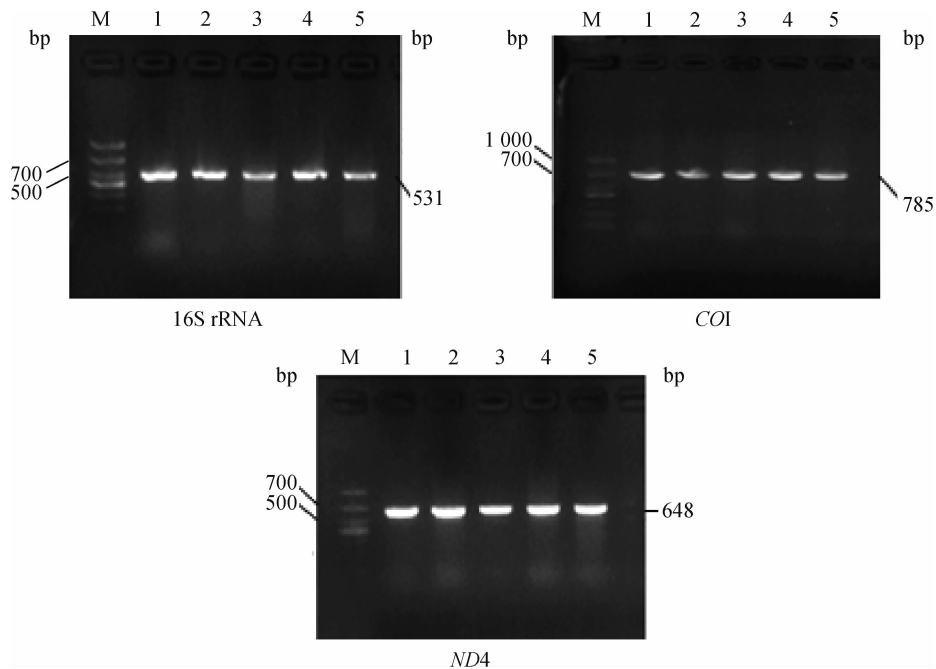
表 2 PCR 引物及扩增条件

Table 2 PCR primers and amplification conditions

基因 Gene	引物序列(5'→3') Primer sequence	扩增条件 Amplification condition	序列长度/bp Length
COI	F: AGGAACAGCCCTYAGTCT R: GGTGGGCTCAAACAATAA	95 °C 5 min; 35 cycles: 94 °C 30 s, 51 °C 30 s, 72 °C 60 s; 72 °C 10 min	785
ND4	F: GCAAAGAATCATTACTACGCAA R: TTGCGACGATTACTAAGGCTA	95 °C 5 min; 35 cycles: 94 °C 30 s, 53 °C 30 s, 72 °C 60 s; 72 °C 10 min	648
16S rRNA	F: TAGCATGAATGGCAACACGA R: GCTCCATTTCTCTTGTCT	95 °C 5 min; 35 cycles: 94 °C 30 s, 53 °C 30 s, 72 °C 60 s; 72 °C 10 min	531

F. 上游引物; R. 下游引物

F. Forward primer; R. Reverse primer



M. DNA 相对分子质量标准; 1~5. 16S rRNA、COI、ND4 基因的 PCR 扩增产物

M. DL1000 marker; 1-5. PCR products of 16S rRNA, COI, ND4

图 1 3 个分子标记的部分 PCR 扩增结果电泳图

Fig. 1 The partial electrophoresis results of PCR amplification for 3 mitochondrial DNA genes

基因序列的碱基特征^[19-20]。共计发现多态性位点 (variable sites) 169 个, 突变位点 (mutations sites) 178 个, 简约信息位点 (parsimony informative sites) 149 个, 其中转换 (transition) 61 个、颠换 (transversion) 7 个、插入/缺失 (insertion/deletion) 7 个。

2.3 新疆野兔遗传多样性评价

57 个野兔样本的合并序列共定义了 43 种单倍型 (表 3)。新疆野兔的 4 个地理组群中, 塔里木盆地周围地区、帕米尔高原地区和北部组群的单倍型

多样性 (h) 较高, 分别为 0.979 ± 0.014 , 0.972 ± 0.064 和 0.972 ± 0.064 , 中部组群的最低, 为 0.891 ± 0.092 ; 北部和中部组群的核苷酸多样性 (π) 较高, 分别为 0.033 ± 0.018 和 0.023 ± 0.015 ; 西南部帕米尔高原地区的最低, 为 0.002 ± 0.001 。中性检验结果显示, 4 个地理组群的 Tajima's D 和 Fu's F_s 绝对值均较小, 除西南部帕米尔高原地区野兔的 Tajima's D 的 P 值小于 0.05, 其他均不显著 ($P > 0.05$), 这说明新疆野兔在进化上遵循中性原则, 各个地理种群稳定。

表 3 基于新疆野兔 mtDNA 3 个分子标记计算的遗传多样性参数

Table 3 Genetic diversity and neutrality test of hares in Xinjiang based on 3 mtDNA genes

组群 Group	样本数 Sample number	单倍型数 Haplotype number	单倍型多样性 Haplotype diversity(h)	核苷酸多样性 Nucleotide diversity(π)	中性检验 Neutrality test	
					Tajima's D	Fu's F_s
北部 Northern group	9	8	0.972±0.064	0.033±0.018	1.289	1.972
中部 The central group	11	8	0.891±0.092	0.023±0.015	0.277	4.288
南部塔里木盆地周围 Around of southern Tarim Basin group	28	21	0.979±0.014	0.007±0.004	-1.352	-3.455
西南部帕米尔高原 Southwest Pamir Plateau group	9	9	0.972±0.064	0.002±0.001	-1.742*	-2.279
总计 Total	57	43	0.989±0.006	0.033±0.016	1.443	-1.748

* . $P < 0.05$

2.4 新疆野兔系统发育关系

为探讨新疆 3 种野兔的分类及亲缘关系,本研究以家兔(*Oryctolagus cuniculus*)为外群,将 57 个新疆野兔及 7 个其它兔属动物的 3 个基因的合并序列采用邻接法和贝叶斯法构建系统发育树,获得的两种树的拓扑结构完全一致。由图 2 可见,本研究的 57 例样本序列明显与其它兔属动物分开,而独自聚为一大枝且被分成置信度较高的 5 个小进化枝,即 Clade A-E,且各个进化枝基本为同域或邻域分布的野兔样本,其中 Clade A 绝大多数为塔里木盆地周围的样本;Clade B 是来自帕米尔高原地区的野兔样本;Clade C 为来自新疆北部和中部地区;Clade D 绝大多数样本分布在新疆中部达坂城和托克逊地区;Clade E 的野兔样本来自新疆北部阿勒泰地区。5 个进化枝又进一步聚为 3 大枝,即 Clade A 的样本均来自新疆南部的塔里木盆地周围地区,用绿色表示;Clade B、C 合为一大枝,用蓝色表示,主要包括新疆西南部帕米尔高原地区的样本;Clade D、E 聚为一大枝,分别用红色和玫红色表示,样本分别来自新疆中部和北部地区。由此可看出,虽然有个别样本混杂,但新疆 3 种野兔的分布还是比较明显的与地理距离和位置相吻合的分布模式。从树上还可以看出,第三大枝中来自新疆中部的野兔(Clade D)与新疆北部的野兔(Clade E)为姊妹群关系,亲缘关系更近。

进一步以 43 个单倍型构建了中介网络图,其结果与系统发育树一致(图 3),合并数据的 43 个单倍

型也明显分为 5 个支系(Clade A-E)3 大枝,其颜色标注与进化树一致。中介网络图中左下方的一大枝(Clade A),为来自新疆南部塔里木盆地周边的野兔样本,左上方的一大枝包含了 Clade B 和 Clade C,其中前者绝大多数来自新疆西南部帕米尔高原,后者是少量新疆中北部地区的野兔样本;右边的一大枝包括 Clade D 和 Clade E,二者均为来自新疆中、北部地区的野兔样本。从中介网络图也可以明显看出,新疆野兔的 5 个支系(Clade A-E)3 大枝又可以进一步划分为两大簇(Clade A、B、C 和 Clade D、E),更清晰地显示出新疆野兔具有较明显的系统地理分布格局,且这种分布格局分别是以天山为界的,即,除 Clade C 中的少量样本,中介网络图中的两大簇正好是来自新疆天山山脉以北和以南两大地区的野兔。

同时,从中介网络图中可以看到,新疆野兔绝大部分单倍型为各地理组群的特有单倍型,共享单倍型只有 3 个,分别为单倍型 H1、H7 和 H18,前两者均为南部塔里木盆地周围地区和西南部帕米尔高原地区共享,后者为中、北部地区野兔共享。说明新疆野兔具有较高的单倍型多样性。另外,图中也可看出中部组群(Clade D)和北部组群(Clade E)共同组成右边的一大簇,且二者突变步数较近。

2.5 新疆野兔遗传距离计算

为更进一步明确新疆野兔的分类地位和亲缘关系,本研究分别计算了进化树上 5 个枝(Clade A-E)的遗传距离,结果显示(表 4),基于 mtDNA 不同标

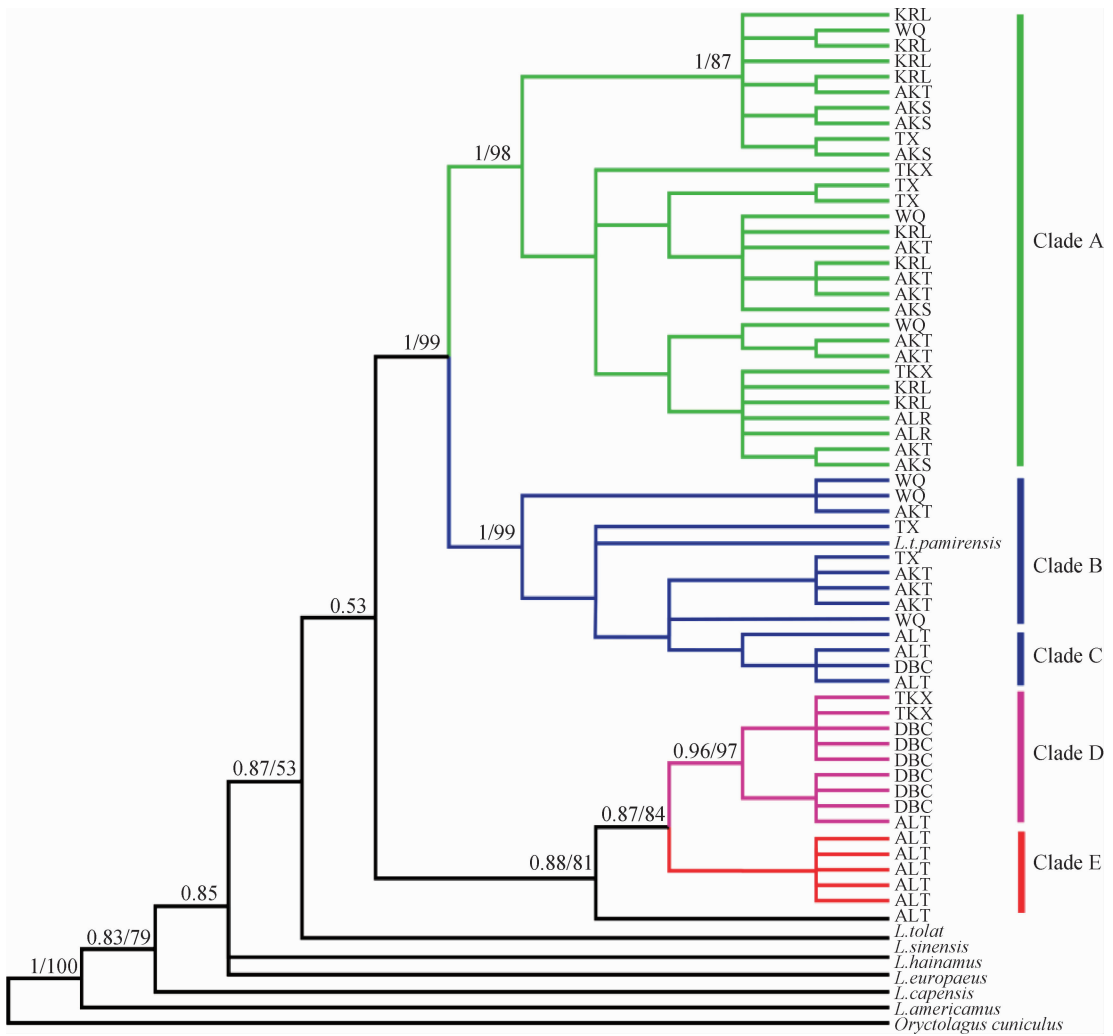


图2 基于 mtDNA 3 个分子标记合并序列构建的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree based on the combined sequence of 3 mtDNA genes

记的遗传距离大小趋势基本一致。16S rRNA 计算的遗传距离最小,范围在 0.05%~3.42%之间;其次是 COI,0.25%~6.15%;ND4 最大,为 1.11%~9.09%。各个进化枝中 Clade A 与其它支系的遗传距离最远,基于 ND4、COI、16S rRNA 的遗传距离分别为 4.21%~8.70%、3.50%~6.15%和 0.70%~3.19%;Clade D 与 Clade E 的遗传距离最小,分别为 2.22%、2.26%和 0.38%。

3 讨论

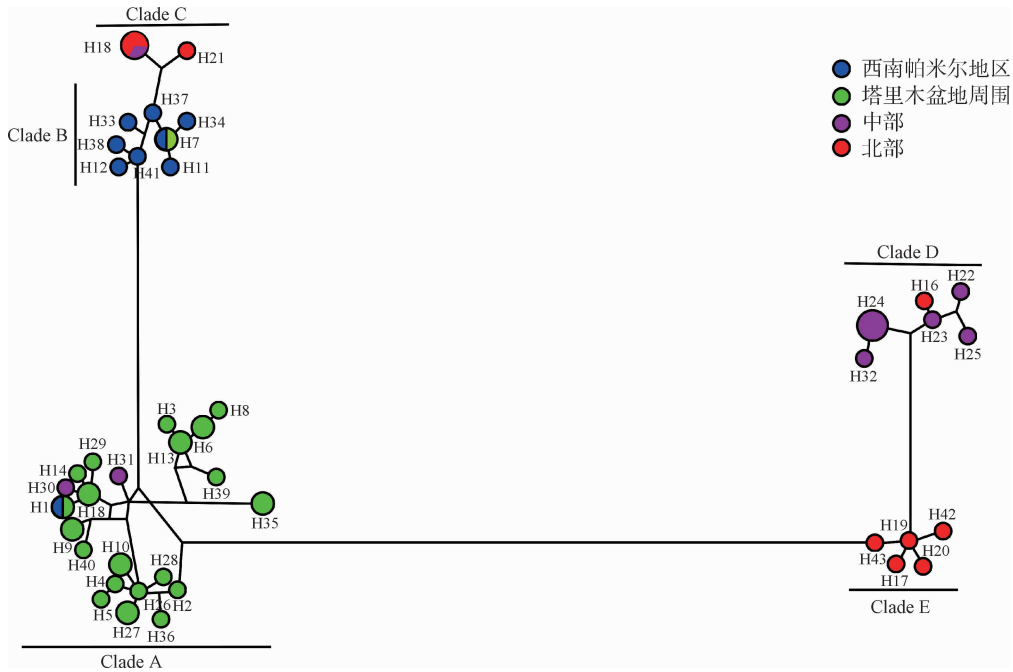
3.1 新疆野兔的遗传结构

本研究基于 mtDNA 3 个标记的系统进化树和中介网络图将新疆 3 种野兔分为明显的 5 个支系,且同域和邻域分布的野兔单倍型在图中基本聚为一枝或一簇。其中,Clade A 和 Clade B 分别为分布在

新疆南部塔里木盆地周围和西南部帕米尔高原地区的野兔,Clade C 中的样本来自于新疆中、北部,Clade D 和 Clade E 分别是分布于新疆中部和北部的野兔样本。由此可以看出,新疆 3 种野兔具有较明显的系统地理结构。中介网络图更清晰地显示出,新疆野兔具有较明显的系统地理分布格局,且这种分布格局是以新疆中部的天山山脉为界的,即除 Clade C 中的少量样本,中介网络图中的两大枝正好是来自天山山脉以北和以南两大地区的野兔。推测这种格局是由于遥远的地理距离、难以跨越的山脉、沙漠等地理隔离造成的^[21]。

3.2 新疆野兔分类地位的考量

兔属物种在形态、基因及地理分布等方面的差异导致其分类困难。近年来,尤其对于分布在新疆西南部帕米尔高原和中部地区的野兔的归属问题尚



圆圈表示每个单倍型;圆的面积与单倍型频率成正比;直线距离代表突变步数;不同颜色表示不同地理组群

The circle represents each haplotype; The area of the circle is proportional to the haplotype frequency; The linear distance represents the number of mutation steps; Different colors represent different geographic groups

图 3 新疆兔属动物 43 个单倍型的中介网络图

Fig. 3 The median-joining network of 43 haplotypes of *Lepus* in Xinjiang

表 4 进化树中 5 个进化枝的遗传距离

Table 4 Genetic distance (p-distance) between 5 clades in phylogenetic tree

	CladeA	CladeB	CladeC	CladeD	CladeE
CladeA	0.007 5(ND4) 0.009 7(COI) 0.001 0(16S rRNA)				
CladeB	0.042 1	0.002 6			
	0.035 0	0.001 0			
	0.007 5	0.001 0			
CladeC	0.046 7	0.011 1	0.001 7		
	0.037 5	0.002 5	0.000 0		
	0.007 0	0.000 5	0.000 0		
CladeD	0.087 0	0.090 6	0.088 1	0.000 4	
	0.061 5	0.048 7	0.049 6	0.002 9	
	0.029 2	0.031 3	0.030 9	0.001 5	
CladeE	0.082 1	0.090 9	0.088 5	0.022 2	0.002 1
	0.055 6	0.045 3	0.047 8	0.022 6	0.001 4
	0.031 9	0.034 2	0.033 7	0.003 8	0.001 7

加粗部分为组群内遗传距离

The bold parts are the genetic distance within groups

未形成统一观点。本研究中,进化树首先证实了新疆野兔与草兔 (*L. capensis*) 的亲缘关系较远。其次,57 条序列明显分为 5 枝,单倍型中介网络图也

得到了相同的结果,进一步分析发现,两种方法构建的系统进化树又聚为 3 大枝,其中,Clade A 所代表的采自新疆南部塔里木盆地的野兔独自聚为一支,

提示其可能为一个独立种。Clade B 为来自西南部帕米尔高原地区的野兔样本,与来自新疆中、北部少量野兔样本的 Clade C 聚为一大枝;而 Clade D、E 中分别来自新疆中部和北部的野兔又聚在一起成为一大枝,亲缘关系很近,为姊妹群关系。3 大枝从进化树上看应为单系,可能是 3 个独立的种。为进一步分析其分类地位,本研究将进化树与遗传距离相结合来探讨。

遗传距离也是物种鉴定的重要依据。物种的种内遗传距离应小于最大种内遗传距离(2%),且种间遗传距离至少是种内遗传距离的 10 倍^[22-23]。研究发现,98% 的脊椎动物种间的遗传距离都大于 2%^[24]。本研究中,进化树上 Clade A-E 的遗传距离在 3 个基因水平的变化规律基本一致,即 Clade D 与 Clade E 间的遗传距离最小(0.38%~2.26%),且并未达到种内遗传距离的 10 倍,提示二者可能是亚种关系;而进化树上不同颜色代表的 3 大枝之间的遗传距离均大于种内距离的 10 倍。此外,已报道的基于 *ND4* 基因的中国 9 种野兔种间的遗传距离为 4.4%~14.2%^[12],本研究计算的新疆野兔 3 大枝之间的遗传距离也在 4.21%~9.09% 之间,符合野兔种间遗传距离水平。因此,综上所述,再结合前述各文献中的记录和描述^[6, 8, 11, 16],本研究进化树中第一大枝 Clade A 中来自塔里木盆地周围地区的野兔,毫无争议为塔里木兔,这也与塔里木兔目前较为明确的分类地位和分布范围相符合^[14-15];第二大枝 Clade B 中来自帕米尔高原地区的野兔与已发表的藏兔帕米尔亚种(*L. t. pamirensis*)聚为一枝,应属于藏兔帕米尔亚种。第三大枝的 Clade D 与 Clade E 合为一枝,与托氏兔(*L. tolai*)聚为一大枝,且二者分布在新疆中、北部地区,均在天山山脉以北,由此,根据其具体分布地、本研究的结果和已有文献报道^[25-26],建议划分为托氏兔的两个亚种,即 Clade D 中的新疆中部野兔为托氏兔中亚亚种,Clade E 中新疆北部的野兔为托氏兔西域亚种。托氏兔的划分结果与程承等^[10]的形态分类结果一致。

3.3 野兔的基因交流与杂交

同时,在进化树和中介网络图中也可以看到有个别样本的混杂,如,两个新疆中、北部地区的野兔与新疆西南部的野兔聚为一大枝;来自新疆中部托克逊的部分野兔并没有与绝大多数中部样本聚在一起,而是与南部塔里木兔(Clade A)聚在一起。帕米尔高原及其周边地区塔什库尔干、阿克陶和乌恰的

野兔在进化树上和中介网络图中也分别聚为 Clade A 和 Clade B 两枝,说明新疆野兔各地理种群之间并未完全隔离,存在一定的基因交流。

也有研究发现,同地域分布的野兔存在显著的形态差异,但却具有相似的 mtDNA 谱系,因而在系统进化和分类上存在很大争议^[27]。本研究中,西南部帕米尔高原地区的野兔分布有塔里木兔(Clade A)和帕米尔藏兔(Clade C)两种,中部托克逊的野兔也有托氏兔(Clade D)和塔里木兔(Clade A)两种,这可能是由新疆复杂的地理环境和气候条件使得相同或相邻地区分布的不同兔属物种发生了杂交所致^[28-29]。帕米尔高原约 1/3 座落于新疆西南部,亦称东帕米尔高原,包括塔什库尔干县全部、阿克陶县大部分及乌恰县南部的高原山区,由纵横交错的山脉以及山脉之间的宽阔谷地构成,地形较开阔坦荡,且与塔里木盆地的西南部接壤;而托克逊与塔里木盆地北部的库尔勒距离较近,且没有明显的地理隔离,因此,为不同种属的野兔发生杂交提供了便利条件。另外,由于气候炎热干旱,新疆大部分地区为荒漠半荒漠地带,植被稀少,对野兔来说,食物短缺也是造成其不断迁移扩散并发生基因交流的一个不可或缺的因素。当然,本研究的结果仅从分子生物学角度对新疆南部和西南部同域或邻域分布的野兔杂交现象做了初步分析,后续还应结合野兔的形态学等方面进一步深入探讨。

3.4 新疆 3 种野兔的遗传多样性

遗传物质突变是产生遗传多样性的根本原因,因此,一个种群内单倍型越多,单倍型多样性和核苷酸多样性指数越高;种群的遗传多样性越高,则反映该种群的进化潜力和适应环境的能力就越强^[30-31]。本研究中,采自新疆塔里木盆地周围的塔里木兔单倍型多样性(*h*)最高,为 0.979 ± 0.014 ,其次是藏兔帕米尔亚种和托氏兔西域亚种,分别为 0.972 ± 0.064 和 0.972 ± 0.064 ;托氏兔西域亚种和中亚亚种的核苷酸多样性 π 较高,分别为 0.033 ± 0.018 和 0.023 ± 0.015 。相比于已报道的其他野兔,如欧兔(*L. europaeus*) $h = 0.988 \pm 0.004$, $\pi = 0.027 \pm 0.003$;雪兔(*L. timidus*) $h = 0.977 \pm 0.027$, $\pi = 0.057 \pm 0.029$;地中海草兔(*L. c. mediterraneus*) $h = 0.870 \pm 0.042$, $\pi = 0.014 \pm 0.008$ 等^[32],新疆的塔里木兔、藏兔和托氏兔均具有较高的遗传多样性水平,从 mtDNA 水平说明新疆野兔具有较丰富的遗传多样性资源。这可能是新疆复杂多样的环境和兔

属动物长远的历史进化,导致了遗传变异在谱系内积累^[33],因此,新疆野兔的遗传变异比较丰富,对各种复杂生境有很强的适应能力和恢复能力^[34]。也可能与新疆野兔具有较大的有效种群数量有关。此外,从中性检验的 Tajima's *D* 和 Fu's *F_s* 结果来看,新疆 3 种野兔群体均符合中性进化假说,因此野兔群体呈现较为稳定的状态^[35],保持了较丰富的遗传多样性现状。

4 结 论

基于 mtDNA 的 *COI*、*ND4*、16S rRNA 分子数据的综合分析,本研究中来自西南部帕米尔高原的野兔应属于藏兔帕米尔亚种;支持将来自于新疆北部阿勒泰及中部达坂城和托克逊地区的野兔分别划分为托氏兔西域亚种和托氏兔中亚亚种。新疆 3 种野兔具有较丰富的遗传多样性,较明显的系统地理分布格局,且存在一定的基因交流。

参考文献 (References):

- [1] TATE G H H. Mammals of eastern Asia [M]. New York: The Macmillan, 1947.
- [2] SMITH A T, XIE Y. A guide to the mammals of China [M]. Princeton: Princeton University Press, 2008.
- [3] 相 雨, 杨奇森, 夏 霖. 中国兔属动物的分类现状和分布 [J]. 四川动物, 2004, 23(4): 391-397.
XIANG Y, YANG Q S, XIA L. Distribution and taxonomy of genus *Lepus* (Hares) in China [J]. *Sichuan Journal of Zoology*, 2004, 23(4): 391-397. (in Chinese)
- [4] LIU J, CHEN P, YU L, et al. The taxonomic status of *Lepus melainus* (Lagomorpha: Leporidae) based on nuclear DNA and morphological analyses [J]. *Zootaxa*, 2011, 3010(1): 47-57.
- [5] 罗泽珣. 中国野兔 [M]. 北京: 中国林业出版社, 1988.
LUO Z X. The Chinese hare [M]. Beijing: China Forestry Publishing, 1988. (in Chinese)
- [6] 惠晓红, 赵明飞. 塔里木兔适应荒漠生态的特性分析 [J]. 当代畜牧, 2013(5): 43-44.
HUI X H, ZHAO M F. Analysis the adaptation characteristics of the Yarkand hare to desert ecology [J]. *Contemporary Animal Husbandry*, 2013(5): 43-44. (in Chinese)
- [7] 潘清华, 王应祥, 岩 崑. 中国哺乳动物彩色图鉴 [M]. 北京: 中国林业出版社, 2007.
PAN Q H, WANG Y X, YAN K. A field guide to the

- mammals of China [M]. Beijing: China Forestry Press, 2007. (in Chinese)
- [8] 王应祥. 中国哺乳动物种和亚种分类名录与分布大全 [M]. 北京: 中国林业出版社, 2003.
WANG Y X. A complete checklist of mammal species and subspecies in China-A taxonomic and geographic reference [M]. Beijing: China Forestry Press, 2003. (in Chinese)
- [9] ANDREW T S, YAN X. Mammal of China [M]. New Jersey: Princeton University Press, 2008.
- [10] 程 承, 葛德燕, 夏 霖, 等. 中国“草兔”头骨的形态计量学研究 [J]. 兽类学报, 2012, 32(4): 275-286.
CHENG C, GE D Y, XIA L, et al. Morphometrics study on the so called 'Cape hare' (Lagomorpha: Leporidae; *Lepus*) in China [J]. *Acta Theriologica Sinica*, 2012, 32(4): 275-286. (in Chinese)
- [11] WU C H, WU J P, BUNCH T D, et al. Molecular phylogenetics and biogeography of *Lepus* in eastern Asia based on mitochondrial DNA sequences [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2005, 37(1): 45-61.
- [12] LI Z C, XIA L, YANG Q S, et al. Population genetic structure of the yarkand hare (*Lepus yarkandensis*) [J]. *Acta Theriol Sin*, 2005, 25(3): 224-228.
- [13] SHAN W J, LIU J, YU L, et al. Genetic consequences of postglacial colonization by the endemic Yarkand hare (*Lepus yarkandensis*) of the arid Tarim Basin [J]. *Chin Sci Bull*, 2011, 56(13): 1370-1382.
- [14] KUMAR B, CHENG J L, GE D Y, et al. Phylogeography and ecological niche modeling unravel the evolutionary history of the yarkand hare, *Lepus yarkandensis* (mammalia: leporidae), through the quaternary [J]. *BMC Evol Biol*, 2019, 19(1): 113.
- [15] 海萨·艾也力汗, 郭 焱, 孟 玮, 等. 新疆裂腹鱼类的系统发生关系及物种分化时间 [J]. 遗传, 2014, 36(10): 1013-1020.
AYELHAN H, GUO Y, MENG W, et al. Phylogeny and divergence time estimation of Schizothoracinae fishes in Xinjiang [J]. *Hereditas (Beijing)*, 2014, 36(10): 1013-1020. (in Chinese)
- [16] 张玉琮, 曾婉琴, 许 盼, 等. 新疆野兔 DNA 条形码筛选 [J]. 畜牧兽医学报, 2020, 51(2): 270-278.
ZHANG Y C, ZENG W Q, XU P, et al. The screening of DNA barcode for hares in Xinjiang [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2020, 51(2): 270-278. (in Chinese)
- [17] SMITH A T, JOHNSTON C H, ALVES P C, et al. Lagomorphs: pikas, rabbits, and hares of the world [M]. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 2018.
- [18] SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANIATIS T.

- Molecular cloning; a laboratory manual[M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [19] NEI M, TAJIMA F. DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases [J]. *Genetics*, 1981, 97(1):145-163.
- [20] DING L, CHEN C M, WANG H, et al. Complete mitochondrial DNA sequence of *Lepus tolai* (Leporidae: *Lepus*) [J]. *Mitochondrial DNA A DNA Mapp Seq Anal*, 2016, 27(3):2085-2086.
- [21] 单文娟, 刘江, 马合木提·哈力克. 新疆草兔的种群遗传结构和亚种分化[J]. *动物学研究*, 2011, 32(2):179-187.
- SHAN W J, LIU J, HALIK M. Genetic structure and subspecies divergence of *Lepus capensis* in Xinjiang [J]. *Zoological Research*, 2011, 32(2):179-187. (in Chinese)
- [22] HEBERT P D N, STOECKLE M Y, ZEMLAK T S, et al. Identification of birds through DNA barcodes [J]. *PLoS Biol*, 2004, 2(10):e312.
- [23] 徐春燕, 刘勇, 马超, 等. 基于 COI 基因的 DNA 条形码技术在石首鱼科鱼类系统分类中的应用[J]. *渔业研究*, 2019, 41(5):359-365.
- XU C Y, LIU Y, MA C, et al. Application of DNA barcoding based on COI gene in phylogenetic classification of Sciaenidae [J]. *Journal of Fisheries Research*, 2019, 41(5):359-365. (in Chinese)
- [24] 杨承忠, 黄杰, 卡迪丽亚·克依木, 等. 沙塘鳢科鱼类的 DNA 条形码及分子系统学研究[J]. *重庆师范大学学报:自然科学版*, 2019, 36(4):137-142.
- YANG C Z, HUANG J, KEYIMU K D L Y, et al. DNA barcoding and molecular systematics of Odontobutidae [J]. *Journal of Chongqing Normal University: Natural Science*, 2019, 36(4):137-142. (in Chinese)
- [25] SHAN W J, TURSUN M, ZHOU S Y, et al. The complete mitochondrial genome sequence of *Lepus tolai* in Xinjiang [J]. *Mitochondrial DNA Part B*, 2020, 5(2):1336-1337.
- [26] SHAN W J, ZHANG Y C, TURSUN M, et al. The complete mitochondrial genome sequence of *Lepus tibetanus pamirensis* [J]. *Mitochondrial DNA Part B*, 2020, 5(2):1359-1360.
- [27] 吴春花. 兔属和盘羊属的分子进化研究[D]. 云南:中国科学院昆明动物研究所, 2005.
- WU C H. Molecular evolution of the genus *Lepus* and *Ovis* [D]. Yunnan: Kunming Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, 2005. (in Chinese)
- [28] 单文娟. 新疆兔属物种的群体遗传学及系统发育关系 [D]. 新疆:新疆大学, 2011.
- SHAN W J. Population genetics and phylogeny of *Lepus* in Xinjiang Uygur autonomous region [D]. Xinjiang: Xinjiang University, 2011. (in Chinese)
- [29] WANG J L, YANG G. Complete mitogenome of cape hare *Lepus capensis* (Lagomorpha: Leporidae) and its phylogenetic considerations [J]. *Acta Theriol Sin*, 2012, 32(1):1-11.
- [30] 姜叶琴. 虾类遗传多样性的研究现状[J]. *海洋学研究*, 2009, 27(1):83-89.
- JIANG Y Q. Status quo of the study on the genetic diversity of shrimps [J]. *Journal of Marine Sciences*, 2009, 27(1):83-89. (in Chinese)
- [31] LOHMAN D J, PEGGIE D, PIERCE N E, et al. Phylogeography and genetic diversity of a widespread Old World butterfly, *Lampides boeticus* (Lepidoptera: Lycaenidae) [J]. *BMC Evol Biol*, 2008, 8:301.
- [32] PIERPAOLI M, RIGA F, TROCCHI V, et al. Hare populations in Europe: intra and interspecific analysis of mtDNA variation [J]. *C R Biol*, 2003, 326 (Suppl 1):80-84.
- [33] 王玲, 黄雯雯, 黄世文, 等. 浙皖鄂地区水稻纹枯病菌 5 个种群的遗传结构分析[J]. *生态学报*, 2010, 30(20):5439-5447.
- WANG L, HUANG W W, HUANG S W, et al. Genetic structure of five populations of the rice sheath blight pathogen *Rhizoctonia solani* AG-1 IA from provinces of Zhejiang, Anhui and Hubei [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2010, 30(20):5439-5447. (in Chinese)
- [34] 赵习彬, 王保健, 简克灵, 等. 基于线粒体细胞色素氧化酶 b (cytb) 全基因序列分析我国部分地区兔痒螨的遗传变异特征 [J]. *畜牧兽医学报*, 2017, 48(4):714-721.
- ZHAO X B, WANG B J, JIAN K L, et al. Analysis of the characteristics of genetic variability within *Psoroptes cuniculi* isolates in some regions of China, inferred by mitochondrial Cytochrome Oxidase b gene [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2017, 48(4):714-721. (in Chinese)
- [35] 李燕方, 古江, 袁媛, 等. 基于线粒体 12S 基因全序列分析我国绵羊痒螨 (兔亚种) 的遗传多样性 [J]. *畜牧兽医学报*, 2018, 49(11):2468-2476.
- LI Y F, GU J, YUAN Y, et al. Genetic diversity of *Psoroptes ovis* var. *cuniculi* determined by the full-length of mitochondrial 12S gene in China [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2018, 49(11):2468-2476. (in Chinese)