

基于 *Cytb* 基因的家养双峰驼分子系统发育研究

程 佳¹, 任战军¹, 王 乐¹, 王洪亮¹, 王咏絮¹, 阿扎提², 杨德青³

(1 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100; 2 新疆畜牧科学院 畜牧研究所, 新疆 乌鲁木齐 830000;

3 青海省大通牛场, 青海 西宁 810102)

[摘要] **【目的】**探讨我国家养双峰驼系统进化及其与野生双峰驼的进化关系, 为科学评价、保护和利用我国双峰驼的遗传资源奠定基础。**【方法】**测定了 37 峰家养双峰驼线粒体细胞色素 *b* (*Cytb*) 的部分基因序列, 并结合 GenBank 中已有的家养和野生双峰驼线粒体细胞色素 *b* 基因序列, 对家养双峰驼进行系统发育分析。**【结果】**测得的家养双峰驼 *Cytb* 基因序列 1 024 bp 的位点中, 有 14 个变异位点, 核苷酸多样性 (Pi) 为 $0.002\,27 \pm 0.001\,27$, 共定义了 11 种单倍型, 单倍型多样性 (Hd) 为 0.820 ± 0.044 , 平均核苷酸差异数 (k) 为 2.327, 表明家养双峰驼群体的 *Cytb* 基因遗传多样性比较丰富。构建的 NJ 系统进化树显示, 家养双峰驼起源于同一母系, 但与野生双峰驼不是同一母系起源。**【结论】**我国家养双峰驼的祖先与现存的野生双峰驼并非同一个亚种。

[关键词] 双峰驼; 细胞色素 *b* 基因; 分子系统发育

[中图分类号] S824.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2009)12-0017-05

Molecular phylogeny of domestic bactrian camel revealed by partial cytochrome *b* gene

CHENG Jia¹, REN Zhan-jun¹, WANG Le¹, WANG Hong-liang¹,
WANG Yong-xu¹, A Zati², YANG De-qing³

(1 College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China; 2 Xinjiang Academy of Animal Science, Urumqi, Xinjiang 830000, China; 3 Qinghai Datong Cattle Farm, Xining, Qinghai 810102, China)

Abstract: **【Objective】** The research was done to discuss the phylogeny of domestic bactrian camel in China and the relationship with wild bactrian camel. **【Method】** The cytochrome *b* (*Cytb*) gene of mtDNA from 37 domestic bactrian camels samples was sequenced and analyzed with the available *Cytb* gene sequences of domestic bactrian camels and *Camelus bactrianus fesus* in GenBank. **【Result】** The results showed that: 14 mutations and 11 different haplotypes were found when *Cytb* gene partial sequence (1 024 bp) was analyzed, the nucleotide diversity (Pi), haplotype diversity (Hd) and average number of nucleotide differences (k) were $0.002\,27 \pm 0.001\,27$, 0.820 ± 0.044 and 2.327 respectively, which showed a relatively rich genetic diversity existed in the domestic bactrian camel. With *Camelus dromedarius* as the outgroup, the phylogenetic tree was constructed by the NJ method. The Chinese domestic bactrian camels we researched had one type of maternal origin, which was of two lineages with wild bactrian camel, and the possibility of wild bactrian camel originating was also discussed. **【Conclusion】** Our phylogenetic analysis revealed that the extant wild bactrian camel may not be the same subspecies at least in their maternal origins.

Key words: bactrian camel (*Camelus bactrianus*); *Cytb* gene; molecular phylogeny

* [收稿日期] 2009-04-08

[基金项目] 国家环境保护部全国生物物种重点调查项目“西部重点动物资源的调查与编目”

[作者简介] 程 佳(1983—), 女, 内蒙古呼和浩特人, 在读硕士, 主要从事动物遗传资源评价、保护和利用研究。

[通信作者] 任战军(1966—), 男, 陕西淳化人, 副教授, 主要从事动物遗传资源研究。E-mail: renzhanjun@yahoo.com.cn

骆驼科动物的始祖起源于距今 5 500~3 800 万年前始新世的北美洲,大约 200 万年前,渡过白令海峡大陆桥进入欧亚大陆,并在欧亚大陆扩散。此期间,双峰驼属可能已经分化为单峰驼和双峰驼。单峰驼的野生祖先在公元纪年初已经灭绝^[1];有报道显示,野生双峰驼一直分布在新疆中部的塔里木和罗布泊及阿尔泰和蒙古之间^[2]。但目前野生双峰驼仅仅发现于蒙古和中国边疆地区戈壁沙漠的小范围地带,而且数量较大熊猫还少^[3]。

由于野生双峰驼与家养双峰驼外形相似,加上分布区有所重合,甚至有野生双峰驼与家养双峰驼发生血统交流。所以,许多学者^[2]认为,家养双峰驼是由野生双峰驼驯化而来;也有人怀疑现存的野生双峰驼是家养双峰驼的野化种群。然而,野生双峰驼的体型、驼峰、毛色与家养双峰驼有明显区别。解剖学研究^[4]证明,家养双峰驼的咽骨较野生双峰驼明显退化,头骨较短,颅顶面凹陷。这些特征与野羊、野猪等有蹄类动物的野生种及家养种呈平行变异,说明野生双峰驼是野生种,而不是家养双峰驼的祖先。中英两国科学家对新疆南部无人区发现的野生双峰驼的 DNA 鉴定结果也表明,这种野生双峰驼的基因与家养双峰驼存在 3% 的差异,属于新的双峰驼物种^[5]。Cui 等^[6]认为,野生双峰驼是独立的物种或亚种。所以,家养双峰驼的祖先是否起源于野生双峰驼,目前尚存在争议。

哺乳动物线粒体细胞色素 *b*(*Cytb*) 基因是 mtDNA 中重要的功能蛋白编码基因,一个较小的基因片段可包含从种内到种间乃至科间的进化遗传信息^[7],因而被广泛应用于哺乳动物种上和种下分类阶元的系统进化研究,被认为是解决系统发育问题最可信的 mtDNA 标记之一^[8]。Lau 等^[9]利用 *Cytb* 基因分析了水牛的系统发育;周材权等^[10]通过对四川矮岩羊线粒体 *Cytb* 基因序列的分析,探讨了四川矮岩羊的物种地位;王洪亮等^[11]利用 *Cytb* 基因全序列,探讨了新疆马鹿系统发生关系及分类地位;张文平^[12]用 *Cytb* 基因序列,对华南虎、东北虎、孟加拉虎进行了聚类分析;张勇等^[13]研究测定了 2 峰阿尔金山野生双峰驼的线粒体 *Cytb* 基因序列,进一步证明了野生双峰驼作为一个独立种这一结论的有效性。

我国家养双峰驼主要分布于内蒙古、新疆、甘肃、青海、宁夏的温带荒漠和荒漠草原区,主要包括新疆南疆驼、北疆驼、东疆驼,甘肃河西骆驼,青海骆驼,内蒙古阿拉善骆驼和苏尼特骆驼等地方品种,但关于它们之间的遗传关系少有报道。为了科学地评

价、保护和利用我国双峰驼宝贵的遗传资源,本研究通过对 37 峰家养双峰驼 *Cytb* 基因序列的分析,探讨了家养双峰驼品种间的系统进化及其与野生双峰驼间的进化关系。

1 材料与方法

1.1 样品来源

分别在阿拉善骆驼(10 峰)、河西骆驼(9 峰)、北疆驼(8 峰)、南疆驼(6 峰)和东疆驼(4 峰)的中心产区内蒙古阿拉善左旗,甘肃永昌县,新疆青河县、温宿县和木垒县,共选 37 峰家养双峰驼颈静脉采血 10 mL/峰,用 ACD 抗凝,冰冻带回实验室,−80 ℃ 冷冻保存。

1.2 主要试剂

Taq DNA 聚合酶由 MBI 提供(附带 10×Buffer, MgCl₂); Tris 饱和酚(天津灏洋生物制品科技有限责任公司);琼脂糖(西班牙原装,由杨凌宝鑫科学器材有限公司提供);dNTPs(北京博大泰克生物基因技术有限公司);蛋白酶 K(AMRESCO)。

1.3 引物

参考文献[13],用 Oligo 6.0 软件设计引物,由上海生物工程技术服务有限公司合成。上游引物: 5'-ATGACAAACATCCGAAATCACACC-3';下游引物: 5'-TCTTCATTTT TAGGATACGGT TTTTCA-3'。

1.4 方法

1.4.1 家养双峰驼 DNA 的提取 采用常规酚/氯法提取 DNA^[11],得到的 DNA 用适量的 EB 溶解。取 4 μL 经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测,并测定 DNA 浓度。DNA 样品于 −20 ℃ 保存。

1.4.2 家养双峰驼 *Cytb* 基因的 PCR 扩增和序列测定 PCR 反应体系为 25 μL: 10×Buffer 2.5 μL, 25 mmol/L MgCl₂ 2.5 μL, 10 mmol/L dNTPs 2.0 μL, 10 μmol/L 的上、下游引物各 1.0 μL, *Taq* DNA 聚合酶 2 U, 5 ng/μL 模板 DNA 3 μL。PCR 反应条件: 94 ℃ 预变性 5 min; 94 ℃ 变性 45 s, 51 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 1 min, 共 35 个循环; 72 ℃ 充分延伸 10 min; 4 ℃ 保存。PCR 产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测,并送上海生物工程技术服务有限公司进行 PCR 产物的纯化、回收与测序。

1.5 *Cytb* 基因序列分析及系统树的构建

将测得的 37 峰家养双峰驼的 *Cytb* 基因部分序列进行拼接,并用 CLUSTAL X 软件与 GenBank 中的序列进行对位排列(表 1),校对后利用 MEGA

4.1 软件计算不同序列间的变异位点、简约信息位点、颠换百分比、转换/颠换比值等参数。然后用 DNAsp 计算单倍型多样性 (*Hd*) 和核苷酸多样性 (*Pi*)。系统发育分析采用邻接 (NJ) 法构建分子系统进化树,并以单峰驼 (*Camelus dromedarius*) 的同源序列作为外群。

表 1 双峰驼 *Cytb* 基因序列的来源
Table 1 Source of the *Cytb* gene of bactrian camel

物种 Species	登录号 Accession number	来源 Source	符号 Code
双峰驼 Bactrian camel	AY126620	GenBank	SFT1
双峰驼 Bactrian camel	AY126621	GenBank	SFT2
双峰驼 Bactrian camel	AY126623	GenBank	SFT3
双峰驼 Bactrian camel	AY126625	GenBank	SFT4
双峰驼 Bactrian camel	FJ171700	GenBank	SFT5
双峰驼 Bactrian camel	FJ171701	GenBank	SFT6
双峰驼 Bactrian camel	FJ171705	GenBank	SFT7
双峰驼 Bactrian camel	FJ171714	GenBank	SFT8
双峰驼 Bactrian camel	FJ171716	GenBank	SFT9
家养双峰驼 Domestic bactrian camel	—	本研究 The research	H01~H11
野生双峰驼 Wild bactrian camel	EF076243	GenBank	YS
单峰驼 Dromedary camel	X56281	GenBank	Dromedary

2 结果与分析

2.1 家养双峰驼 *Cytb* 基因序列及其变异分析

双峰驼的 *Cytb* 基因全长 1 140 bp,本研究获得了其中 1 024 bp 的序列。在测得的 37 条序列中,A、T、C、G 碱基的平均含量分别为 28%,27.9%,28.9%和 15.2%,说明 G 碱基的含量相对较低;A+T 的平均含量(55.9%)高于 G+C 的平均含量(44.1%)。密码子第 2 位和第 3 位均表现出明显的碱基使用偏倚;密码子第 2 位中,T 碱基频率高达 41.0%,而 G 仅为 14.1%;密码子第 3 位中,A 碱基频率达 38.7%,而 G 仅为 7.9%。

在所测定的 1 024 bp 的位点中,共有 14 个变异位点,占分析位点总数的 1.37%,包括 13 个转换和 1 个颠换,其中简约信息位点 1 个,无插入或缺失。核苷酸的替代主要以转换为主,转换明显多于颠换,

转换/颠换比值(*R*)为 5.011,其中 T-C 转换明显多于 A-G 转换。由 37 峰家养双峰驼 *Cytb* 基因的部分序列定义了 H01~H11 共 11 种单倍型(图 1),单倍型多样性 (*Hd*) 为 0.820±0.044,核苷酸多样性 (*Pi*) 为 0.002 27±0.001 27,平均核苷酸差异数 (*k*) 为 2.327,表明家养双峰驼群体的 *Cytb* 基因遗传多样性比较丰富。这与权洁霞等^[14]利用 RFLP 技术对中国家养双峰驼 3 个种群遗传多样性的研究结果一致。

在 11 种单倍型中,有 7 种属于品种间特有的单倍型(H02、H03、H04、H06、H07、H09、H10),其余 4 种为品种间或品种内共享的单倍型(H01、H05、H08、H11)。其中阿拉善骆驼群体有 7 种单倍型,其次是东疆驼,有 4 种单倍型,甘肃河西骆驼只有 1 种单倍型(H08)。

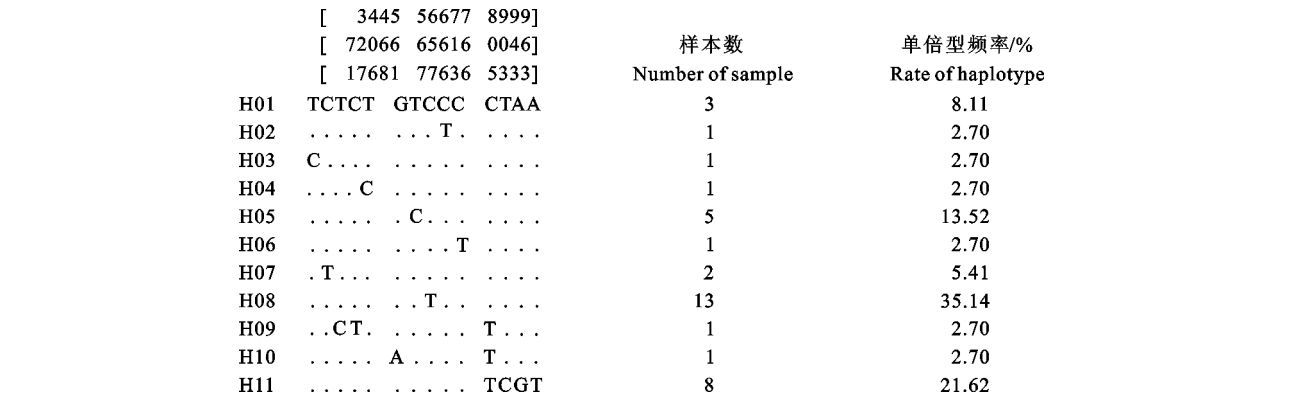


图 1 家养双峰驼 11 种单倍型的多态位点
Fig. 1 Sequence variations detected in 11 haplotypes of domestic bactrian camel

2.2 家养双峰驼 *Cytb* 基因分子系统进化树的构建

利用测定的家养双峰驼 *Cytb* 基因部分序列的 11 种单倍型,结合 GenBank 中双峰驼的同源序列,以单峰驼为外群,应用 NJ 法构建了双峰驼的分子系统进化树,结果见图 2。由图 2 可见,阿拉善骆驼、河西骆驼、北疆驼、南疆驼和东疆驼 5 种家养双峰驼均为 1 个母系起源。家养双峰驼与野生双峰驼并非一个母系起源,可以推断现存的野生双峰驼是 1 个独立的支系,不是家养双峰驼的直接祖先。这支持了 Cui 等^[6]、高宏巍等^[15]的研究结果,但与吉日本图^[16]用 AFLP 方法,以羊驼(*Lama pacos*)为外群得出的现存野生双峰驼是家养双峰驼祖先的结果不一致。

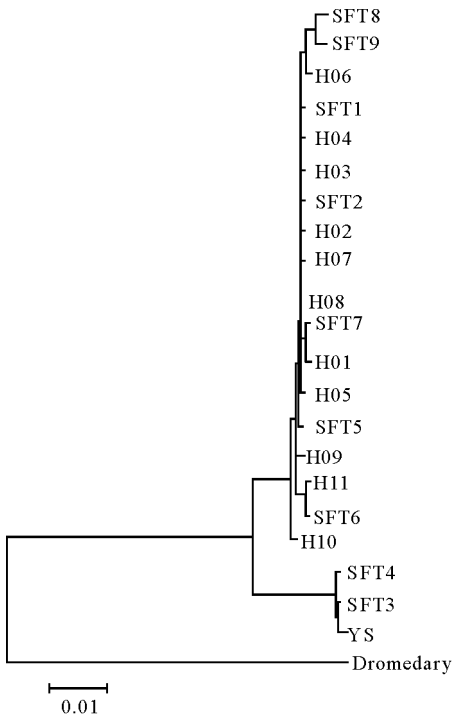


图 2 邻接法构建的双峰驼 *Cytb* 基因系统进化树
Fig. 2 Phylogenetic tree of bactrian camel *Cytb* gene constructed by the NJ method

3 讨 论

从本研究构建的 NJ 系统进化树中可以看出,家养双峰驼和野生双峰驼并非一个母系起源,至少是起源于不同的亚种。可以推断,家养双峰驼的祖先与现存的野生双峰驼已经发生了分化,家养双峰驼的直系祖先可能已经灭绝。

对甘肃河西骆驼的 *Cytb* 基因分析发现,其基本属于一个单倍型(H08),但与其他单倍型的遗传距离为 0.000 0~0.014 9,而骆驼科其他属的种内差

异为 1.2%~2.5%^[17],说明甘肃家养双峰驼与其他群体之间的差异尚未达到种间差异水平,这与张勇等^[13]的研究结果相近。所以在分子水平上河西骆驼还不是一个独立的类型。

从单倍型的分支及其各自包含的样本来看,H09 和 H10 是南疆驼特有的单倍型,说明南疆驼是一个相对独立的种群,这可能是由于南疆的生态环境较差,与其他地区相距较远,来往不频繁所致;而北疆驼的样本包含在不止 1 个单倍型中。这与传统分类学把新疆骆驼分为北疆驼和南疆驼的结论一致^[18],本研究结果为两者的进化关系提供了分子遗传学水平上的依据。

其余的单倍型(H01、H02、H03、H04、H07、H08)中包含了各个种群的样本,说明我国家养双峰驼之间存在一定程度的基因交流。由于双峰驼是古丝绸之路之上重要的交通工具,从而使得我国古丝绸之路周围的双峰驼种群基因交流的机会大大增加。另外,新疆北部还经常从甘肃的河西地区和内蒙古的阿拉善境内引种,这也加大了双峰驼间基因的流动,从而使北疆驼的基因中混有其他种群的基因,导致北疆驼与其他种群的共享单倍型较多。

为了进一步研究家养双峰驼之间及其与现存野生双峰驼的遗传关系,在后续研究中应加大样本含量和增加品种数量,并对 *Cytb* 基因的全序列、线粒体 DNA 的全序列,或者双峰驼细胞核基因进行深入研究,以期系统掌握双峰驼的进化历史。

[参考文献]

[1] 常 洪. 动物遗传资源学 [M]. 北京: 科学出版社, 2009.
Chang H. Animal genetic resources [M]. Beijing: Science Publishing House, 2009. (in Chinese)

[2] 袁国映, 李红旭, 张 莉, 等. 世界野生双峰驼的分布、数量及其保护 [C]. 中国动物科学研究——中国动物学会第十四届会员代表大会及中国动物学会 65 周年年会论文集. 北京: 中国林业出版社, 1999: 658-665.
Yuan G Y, Li H X, Zhang L, et al. Distribution and quantity of the wild two-humped camel in the world and suggestion for conservation of them [C]. Zoological Studies in China——Conference Proceeding of the 14th China Zoological Society Member Congress and the 65th Anniversary of CZS. Beijing: China Forestry Publishing House, 1999: 658-665. (in Chinese)

[3] 阿不都克里木·亚克甫. 塔克拉玛干最后的守望者——野双峰驼 [J]. 绿色中国, 2001(5): 55-56.
A Budukelimu · Yakefu. The last watcher in Taklamakan desert——wild two-humped camel [J]. Green China, 2001(5): 55-56. (in Chinese)

[4] 曹 戈, 张晶晶. 寻找楼兰最后野双峰驼的存在之谜 [J]. 绿化

- 与生活,2001(2):4-5.
- Cao G, Zhang J J. Looking for the myth of last wild two-humped camel in Loulan [J]. Greening and Life, 2001(2):4-5. (in Chinese)
- [5] 艾 云. 沙漠之王——嘎顺戈壁双峰野骆驼 [J]. 大自然, 2008(9):49.
- Ai Y. Lord of the desert——wild two-humped camel in gashun Gobi [J]. China Nature, 2008(9):49. (in Chinese)
- [6] Cui P, Ji Rimutu, Ding F, et al. A complete mitochondrial genome sequence of the wild two-humped camel (*Camelus bactrianus ferus*): an evolutionary history of camelidae [J]. BMC Genomics, 2007, 8:241.
- [7] Kocher T D, Thotmas 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.
- [8] Ardoya R, Meyer A. Phylogenetic performance mitochondrial protein coding genes in resolving relationship among vertebrates [J]. Mol Biol Evol, 1996, 13:933-942.
- [9] Lau C H, Drinkwater R D, Yusoff K, et al. Genetic diversity of Asian water buffalo (*Bubalus bubalis*) mitochondrial DNA D-loop and cytochrome *b* sequence variation [J]. Animal Genetics, 1998, 29:253-264.
- [10] 周材权, 周开亚, 胡锦涛. 从线粒体细胞色素 *b* 基因探讨矮岩羊物种地位的有效性 [J]. 动物学报, 1999, 45(3):332-338.
- Zhou C Q, Zhou K Y, Hu J C. The validity of the dwarf bharal (*Pseudois schaeferi*) species status inferred from mitochondrial *Cytb* gene [J]. Acta Zoologica Sinic, 1999, 45(3):332-338. (in Chinese)
- [11] 王洪亮. 新疆 3 个马鹿亚种系统发育与遗传多样性研究 [D]. 陕西杨凌:西北农林科技大学, 2008.
- Wang H L. Research on phylogenesis and genetic diversity of three subspecies of *Wapiti* (Red Deer) in Xinjiang [D]. Yangling, Shaanxi: Northwest A&F University, 2008. (in Chinese)
- [12] 张文平. 华南虎、东北虎、孟加拉虎的 D-loop、ND5、16SrRNA、*Cytb* 序列及其在系统进化研究中的应用 [D]. 四川成都:四川大学, 2005.
- Zhang W P. The sequence differences of D-loop, ND5, 16SrRNA, *Cytb* and their phylogenetic relationships in *Panthera tigris altaica*, *P. t. amoyensis* and *P. t. tigris* [D]. Chengdu, Sichuan: Sichuan University, 2005. (in Chinese)
- [13] 张 勇, 张会斌, 刘志虎, 等. 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 [J]. 浙江大学学报:理学版, 2008, 35(1):88-91.
- Zhang Y, Zhang H B, Liu Z H, et al. Molecular phylogeny of Altun Mountain wild *Camelus bactrianus* revealed by partial cytochrome *b* gene sequences of mitochondrial DNA [J]. Journal of Zhejiang University: Science Edition, 2008, 35(1):88-91. (in Chinese)
- [14] 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):383-389.
- Quan J X, Zhang Y P, Han J L, et al. Genetic diversity of mtDNA on domestic camels (*C. bactrianus*) in China [J]. Acta Genetica Sinica, 2000, 27(5):383-389. (in Chinese)
- [15] 高宏巍, 吉日木图, 孟 和. 利用微卫星标记分析双峰驼进化和遗传多样性 [J]. 上海交通大学学报:农业科学版, 2009, 27(2):89-95.
- Gao H W, Ji Rimutu, Meng H. Analysis on the genetic diversity and evolution in the *Camelus bactrianus* using SSR markers [J]. Journal of Shanghai Jiaotong University: Agricultural Science Edition, 2009, 27(2):89-95. (in Chinese)
- [16] 吉日木图. 双峰家驼与野驼分子进化及驼乳理化特性研究 [D]. 内蒙古呼和浩特:内蒙古农业大学, 2006.
- Ji Rimutu. Studies on molecular evolution of domestic and wild bactrian and the physical-chemical properties of camel milk [D]. Huhhot, Inner Mongolia: Inner Mongolia Agricultural University, 2006. (in Chinese)
- [17] 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.
- [18] 宁夏农学院. 养驼学 [M]. 2 版. 北京:农业出版社, 1991:2-5.
- Ningxia College of Agriculture. Domestication of camel [M]. 2nd ed. Beijing: Chinese Cultivation Agriculture Publishing House, 1991:2-5. (in Chinese)

(上接第 16 页)

- [18] Wei H H, Justin K K, Ming D L. Identification and characterization of a long isoform of human IFT80, IFT80-L [J]. Bbrc, 2008, 373(4):653-658.
- [19] Neer E J, Schmidt C J, Nambudripad R, et al. The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins [J]. Nature, 1994, 371(6495):297-300.
- [20] Han Z F, Guo L, Wang H Y, et al. Structural basis for the specific recognition of methylated histone H3 lysine 4 by the WD-40 protein WDR5 [J]. Molecular Cell, 2006, 22(1):137-144.
- [21] Smith T F. Diversity of WD-repeat proteins [J]. Subcell Biochem, 2008, 48:20-30.
- [22] William S, Song T. Recombinant protein complex expression in *E. coli* [J]. Current Protocols in Protein Science, 2008, 21(5):324-321.