

西北马鹿群体遗传多样性及系统地位

邓铸疆¹,任战军¹,熊建杰¹,宋旭旭¹,王洪亮¹,王 乐²

(1 西北农林科技大学 动物科技学院,陕西 杨凌 712100;2 西溪国家湿地公园生态研究中心,浙江 杭州 310013)

[摘要] 【目的】揭示西北马鹿(*Cervus elaphus*)群体的遗传多样性及系统地位,为科学地保护和利用我国西北地区马鹿资源提供基础研究材料。【方法】对塔里木马鹿、阿尔泰马鹿、天山马鹿、甘肃马鹿及阿拉善马鹿 5 个群体 108 个个体的 D-loop 全序列进行扩增、测序,分析其碱基组成及变异,构建系统发育树,研究西北马鹿群体遗传结构、群体遗传多样性及其系统地位。【结果】共检测到 40 个单倍型,平均单倍型多样性(Hd)为 0.998 ± 0.006 ,平均核苷酸多样性(Pi)为 0.041 ± 0.005 ,平均核苷酸差异数(K)为 36.08。构建 NJ 和 MP 分子系统发育树发现,塔里木马鹿与其他马鹿遗传距离较远,分属于不同的类群;阿尔泰马鹿、天山马鹿及甘肃马鹿之间均存在基因交流,可能是群体间引种杂交所致。【结论】西北地区马鹿整体遗传多样性丰富;中国马鹿可能起源于欧洲;部分马鹿群体间存在基因交流情况。

[关键词] 西北马鹿;mtDNA;D-loop;遗传多样性;系统地位

[中图分类号] S825.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2010)09-0042-05

Genetic diversity and classification status of wapiti (red deer) in northwest of China

DENG Zhu-jiang¹, REN Zhan-jun¹, XIONG Jian-jie¹, SONG Xu-xu¹,
Wang Hong-liang¹, Wang Le²

(1 College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;
2 Xixi National Park Research Center for Ecological Sciences, Hangzhou, Zhejiang 310013, China)

Abstract: 【Objective】The research was conducted to explore the genetic diversity and classification status of wapiti(*Cervus elaphus*) in northwest of China, to provide research materials for scientific protection and utilization of red deer. 【Method】The whole D-loop sequences of five wapiti subspecies (Talim wapiti, Altai wapiti, Tianshan wapiti, Gansu wapiti and Alashan wapiti 108 samples in all) were amplified and sequenced, the base composition and nucleotide sequences variation analyzed, phylogenetic trees built, the genetic diversity and classification status of red deer in northwest of China studied. 【Result】There were 40 different haplotypes, the haplotype diversity (Hd) was 0.998 ± 0.006 , nucleotide differences (Pi) 0.041 ± 0.005 , average number of nucleotide differences $K = 36.08$. The NJ and MP phylogenetic trees showed that, Talim wapiti had further genetic distance with another subspecies, which should be clustered in different wapiti types; the gene exchange was found in Altai wapiti, Tianshan wapiti and Gansu wapiti, suspiciously due to the hybridization caused by introduction in different populations. 【Conclusion】Rich genetic diversity exists in wapiti in northwest of China. China red deer may have originated in Europe, for gene exchange is found in different populations.

Key words: wapiti (red deer); mtDNA; D-loop; genetic diversity; classification status

* [收稿日期] 2010-03-11

[基金项目] 国家林业局珍稀濒危动植物救护繁育项目“马鹿救护繁育”(2005K148)

[作者简介] 邓铸疆(1983—),男,新疆霍城人,在读硕士,主要从事特种经济动物饲养研究。E-mail: wytzdj@163.com

[通信作者] 任战军(1966—),男,陕西淳化人,副教授,主要从事特种经济动物饲养、动物遗传资源学研究。

马鹿(*Cervus elaphus*)在我国有 8 个亚种^[1-2],分别为天山亚种(*C. e. songaricus*)、塔里木亚种(*C. e. yarkandensis*)、阿尔泰亚种(*C. e. sibiricus*)、甘肃亚种(*C. e. kansuensis*)、阿拉善亚种(*C. e. alashanicus*)、四川亚种(*C. e. macneilli*)、西藏亚种(*C. e. wallichii*)和东北亚种(*C. e. xanthopygus*)^[3],其中 5 个亚种分布于西北地区。目前,国内对西北马鹿地方品种或类型遗传资源的系统性研究不足,部分研究结果还存在争议。李明等^[4]和邢秀梅等^[5]关于马鹿细胞色素 b 基因片段序列的研究结果均表明,天山马鹿东西两个类群的分化较大,有可能是 2 个不同的亚种。王洪亮等^[6]的研究结果表明,天山马鹿的遗传多样性处于中等水平,与贾斌等^[7]关于天山马鹿遗传变异度相对较高的研究结果不太一致;其对塔里木马鹿和阿尔泰马鹿遗传多样度的研究结果与邢秀梅等^[8]利用血液蛋白多态性的研究结果相

反。而且国内缺少关于西北马鹿群体遗传现状的数据资料和系统性研究,对甘肃、阿拉善等亚种关注较少,相关研究很少涉及 D-loop 序列。

本试验拟通过对西北地区 5 个马鹿群体 108 个个体线粒体 DNA D-loop 序列的测定、分析,从分子水平研究西北马鹿群体遗传结构、遗传多样性以及系统地位,以期深入了解我国西北地区马鹿各群体的遗传资源现状,探讨其系统进化,为保护和科学利用马鹿遗传资源提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 材 料

试验所用西北地区 5 个马鹿群体血样分别采自新疆、宁夏、甘肃及青海 4 省,其中甘肃群体样本来自甘肃及青海省,样品于-80 ℃保存,测序数量及采集地点见表 1。

表 1 试验用马鹿群体数量及采集地
Table 1 Number and Sources of sample

种群及代码 Population and abbreviation	测序数量 Sequencing number	采样地 Sampling site
塔里木马鹿 <i>C. e. yarkandensis</i>	25	新疆尉犁 Weili county of Xinjiang
阿尔泰马鹿 <i>C. e. sibiricus</i>	17	新疆北屯 Beitun city of Xinjiang
天山马鹿 <i>C. e. songaricus</i>	22	新疆伊宁 Yi'ning city of Xinjiang
甘肃马鹿 <i>C. e. kansuensis</i>	33	甘肃肃南县及青海祁连县、大通县 Su'nan county of Gansu,Qilian and Datong county of Qinghai
阿拉善马鹿 <i>C. e. alashanicus</i>	11	宁夏银川 Yinchuan city of Ningxia

1.2 DNA 提取

采用常规的酚/氯仿法提取各血样的总 DNA^[9]。

1.3 引物设计及 PCR 扩增

所用引物根据 GenBank 中已发表的马鹿线粒体基因全序列(登录号为:NC_007704)自行设计。正链引物(P1)序列为 5'-CCTCATACCAATCAC-CAGCACAATC-3',反链引物(P2)序列为 5'-GGT-GTGGCTGTTCAAGGTGTCG-3',引物由上海英俊生物技术有限公司合成。

PCR 反应体系为 15 μL,其中模板 DNA 1 μL,10×buffer 1.5 μL,dNTP 1.5 μL,引物 P1、P2 各 0.75 μL,Taq 酶 0.15 μL,ddH₂O 9.35 μL。反应条件:95 ℃预变性 5 min;94 ℃变性 30 s,53 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 1 min,40 个循环;72 ℃延伸 10 min,将扩增产物于 4 ℃保存。

1.4 序列测定

PCR 产物用 10 g/L 的琼脂糖凝胶电泳检测,选择扩增效果好的样品,送上海生工生物工程技术有限公司进行回收纯化及测序。

1.5 数据分析

首先将测得的 108 条马鹿线粒体 DNA D-loop 序列经 Contig Express 软件拼接、校正后生成完整的序列,然后用 CLUSTALX 软件进行同源序列比对后,使用分子进化遗传分析软件 MEGA 4.1 确定单倍型数目与多态位点,构建分子系统树。应用 DNASP 5.1.0 软件统计分析单倍型多样性(*Hd*)、核苷酸多样性(*Pi*)以及平均核苷酸差异数(*K*)。

1.6 代码及简写

为分析和表述方便,对本研究中各马鹿群体及引用的相关物种分别使用不同代码和简写,具体如下:塔里木马鹿,TLM;阿尔泰马鹿,AET;天山马鹿,TS;甘肃马鹿,GS;阿拉善马鹿,NX;代码后的数字为不同群体内各单倍型顺序号;麋鹿,Napu;加拿大马鹿,Canada;美国马鹿,USA;英国马鹿,UK;匈牙利马鹿,Hungary;意大利马鹿,Italy;梅花鹿,Sika。

2 结果与分析

2.1 马鹿群体 D-loop 全序列的碱基组成

由表 2 可知,5 个马鹿群体 D-loop 全序列及各

群体之间碱基组成相似,T、C、A、G 碱基的平均含量分别为 32.1%,22.1%,30.0%和 15.7%,G 碱基在 D-loop 序列中相对缺乏。

表 2 西北地区 5 个马鹿群体 D-loop 序列碱基组成的比较
Table 2 Base composition in D-loop sequence for five red deer populations in northwest of China %

群体 Population	T	C	A	G	A+T	G+C
塔里木马鹿 <i>C. e. yarkandensis</i>	32.2	22.9	29.4	15.5	61.6	38.4
阿尔泰马鹿 <i>C. e. sibiricus</i>	31.5	22.7	30.2	15.5	61.8	38.2
天山马鹿 <i>C. e. songaricus</i>	31.7	22.3	30.3	15.7	62.0	38.0
甘肃马鹿 <i>C. e. kansuensis</i>	32.3	21.7	30.2	15.8	62.5	37.5
阿拉善马鹿 <i>C. e. alashanicus</i>	31.8	22.2	30.1	16.0	61.8	38.2

2.2 马鹿群体的单倍型分析

5 个马鹿群体 108 个个体共定义了 40 个单倍型,其中阿尔泰马鹿中的 AET3 型与塔里木马鹿中的 TLM1 型完全相同,为不同群体间共享类型。40 个单倍型的 Hd 为 0.998 ± 0.006 , Pi 为 0.041 ± 0.005 。阿尔泰马鹿有 3 个单倍型, Hd 为 0.721 ± 0.079 , Pi 为 0.015 ± 0.008 ,有 61 个突变位点和 59 个简约信息位点;天山马鹿有 10 个单倍型, Hd 为 0.90 ± 0.036 , Pi 为 0.022 ± 0.0018 ,有 67 个突变位点和 51 个简约信息位点;塔里木马鹿有 9 个单倍型, Hd 为 0.683 ± 0.10 , Pi 为 0.017 ± 0.006 ,有 113 个突变位点和 33 个简约信息位点;甘肃马鹿有 16 种单倍型, Hd 为 0.919 ± 0.032 , Pi 为 0.011 ± 0.004 ,有 118 个突变位点和 24 个简约信息位点;阿

拉善马鹿有 3 个单倍型, Hd 为 0.727 ± 0.068 , Pi 为 0.0068 ± 0.002 ,有 15 个突变位点和 15 个简约信息位点。

2.3 马鹿群体 D-loop 全序列的变异分析

对所有马鹿群体 40 个单倍型序列进行比对,结果发现突变位点有 226 个,简约信息位点有 118 个,碱基插入及缺失数为 124,由于塔里木马鹿所有个体 D-loop 序列与其他群体相比,在 173~248 bp 处缺少 1 段长为 76 bp 的序列,造成插入缺失在碱基变异中所占比例过高;所有单倍型平均核苷酸差异数 $K=36.08$,碱基转换/颠换比例 $R=2.349$ 。通过对各群体间遗传距离分析(表 3)发现,塔里木马鹿与其他 4 个马鹿群体间遗传距离最远。

表 3 西北地区 5 个马鹿群体间遗传距离分析
Table 3 Genetic distances between five red deer populations in northwest of China

群体 Population	阿尔泰马鹿 <i>C. e. sibiricus</i>	塔里木马鹿 <i>C. e. yarkandensis</i>	甘肃马鹿 <i>C. e. kansuensis</i>	天山马鹿 <i>C. e. songaricus</i>	阿拉善马鹿 <i>C. e. alashanicus</i>
阿尔泰马鹿 <i>C. e. sibiricus</i>	0				
塔里木马鹿 <i>C. e. yarkandensis</i>	0.058	0			
甘肃马鹿 <i>C. e. kansuensis</i>	0.037	0.073	0		
天山马鹿 <i>C. e. songaricus</i>	0.035	0.075	0.030	0	
阿拉善马鹿 <i>C. e. alashanicus</i>	0.034	0.071	0.027	0.026	0

2.4 马鹿群体系统进化树的构建

以麝鹿 (*Tragulus napu*) 的序列 (GenBank 登录号:AF264000) 作为外类群,结合所有群体 41 个单倍型序列(群体间共享单倍型分别列出),应用 MEGA 4.1 软件分别采用邻接法 (Neighbor-jointing, NJ) 和最大简约法 (Maximum-parsimony, MP) 构建分子系统发育树,结果如图 1 所示。由图 1 可知,所构建的 NJ 和 MP 树具有相似的拓扑结构,在以麝鹿为外群的聚类图中,5 个马鹿群体分为 2 个大的类群,塔里木马鹿和其他 4 个群体分属于不同类群。

从每个群体各选取 2 个典型单倍型,结合 GenBank 中公布的部分马鹿和梅花鹿序列,构建 NJ 树(图 2)。由图 2 可见,所有马鹿及梅花鹿分别聚为 2

个类群,其中阿尔泰、甘肃、天山和阿拉善马鹿与北美马鹿 (Canada、USA) 遗传距离较近,与梅花鹿 (Sika) 同聚为类群 I,塔里木马鹿则与欧洲马鹿 (UK、Hungary、Italy) 聚为类群 II,塔里木马鹿与其他群体间遗传距离较梅花鹿更远。

3 讨 论

我国是世界上马鹿亚种分布最多的国家^[10]。李明等^[4]及刘向华等^[11]关于国内马鹿亚种遗传差异的研究结果均表明,马鹿各亚种间都达到了亚种分化的水平,遗传多样性比较丰富。本研究发现,西北 5 个马鹿群体共有 40 个单倍型,除阿尔泰马鹿与塔里木马鹿有 1 个共享单倍型外,所有群体均具有多个独立单倍型;单倍型多样性及核苷酸多样性较

高,遗传多样性相当丰富。甘肃马鹿样本分别来自甘肃、青海 2 省,但分析过程中发现不同群体间存在共享单倍型,建立进化树时除 GS9 外,其他单倍型均聚为一类,群体间遗传距离很近,从分子水平上证明了甘肃马鹿和青海马鹿同属于甘肃亚种。阿尔泰

马鹿和阿拉善马鹿单倍型和变异位点相对较少,可能是由于样品来自人工驯养群体,驯养规模小,起源单一造成的。在样品采集过程中,除甘肃马鹿外,其他马鹿都分别来自单一个体,由此带来的样本涵盖不全问题还有待于进一步研究完善。

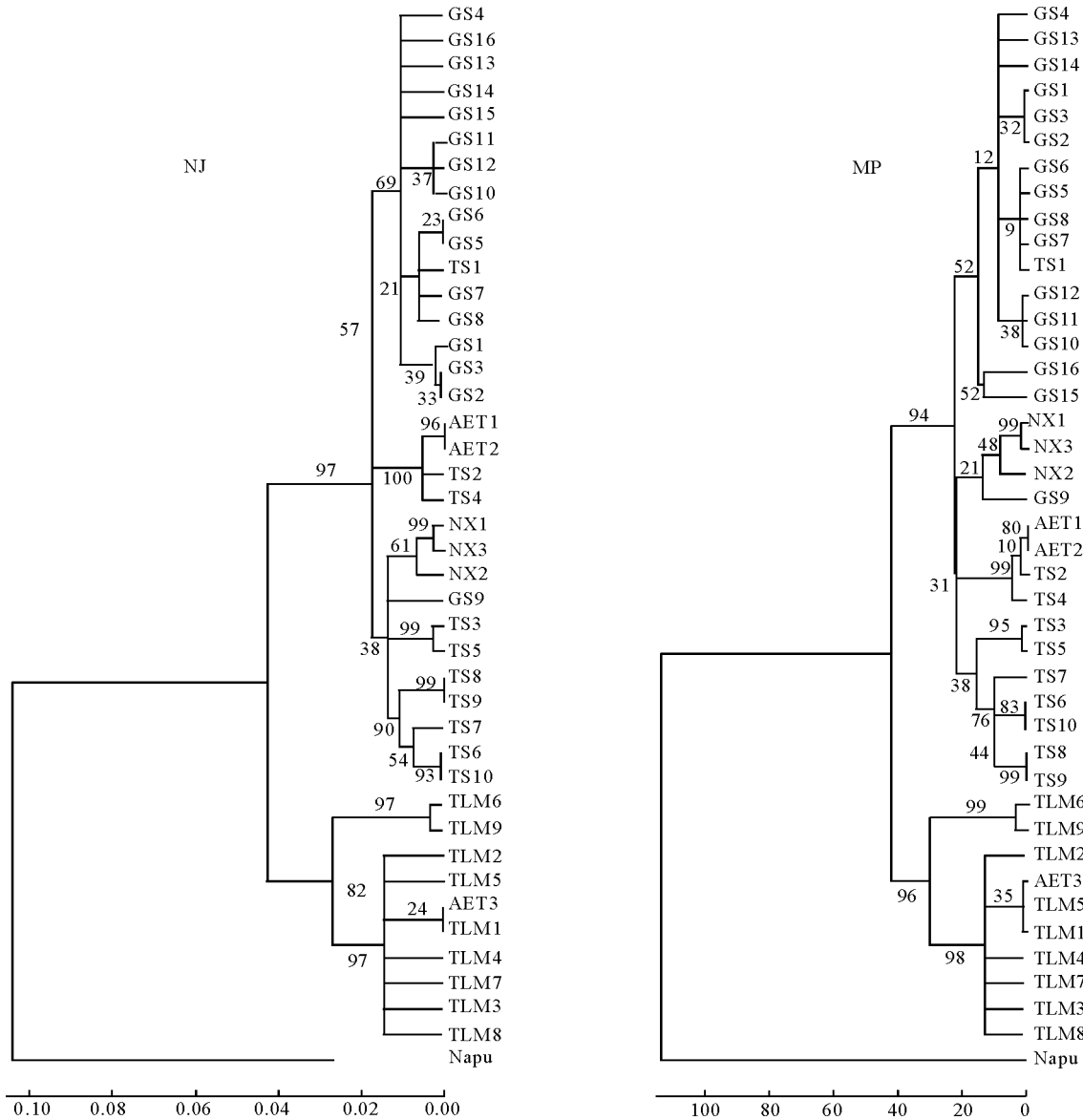


图 1 基于西北马鹿群体 D-loop 基因各单倍型构建的 NJ 树与 MP 树

Fig. 1 NJ tree and MP tree of different haplotypes of red deer populations in northwest of China based on mtDNA D-loop gene

关于马鹿的起源,目前部分学者认为,马鹿起源于欧洲,在向东迁徙分化过程中由欧洲马鹿分化出亚洲马鹿、美洲马鹿和梅花鹿^[12];也有学者认为马鹿起源于亚洲梅花鹿,在向欧洲迁徙后向亚洲回返过程中分化出马鹿^[13-15]。本试验利用所得的D-loop序列构建系统发育树,并将其与 GenBank 中其他马鹿及梅花鹿序列比较发现,塔里木马鹿属于欧洲类

群,而其他 4 个群体则属于亚洲、美洲类群,并且塔里木马鹿与其他马鹿的遗传距离较梅花鹿和其他马鹿更远,因此本研究结果支持了马鹿起源于欧洲的观点。产生这种现象可能是因为塔里木马鹿在早期与其他群体分化后,在一个相对封闭的自然环境中独立进化所致^[16]。

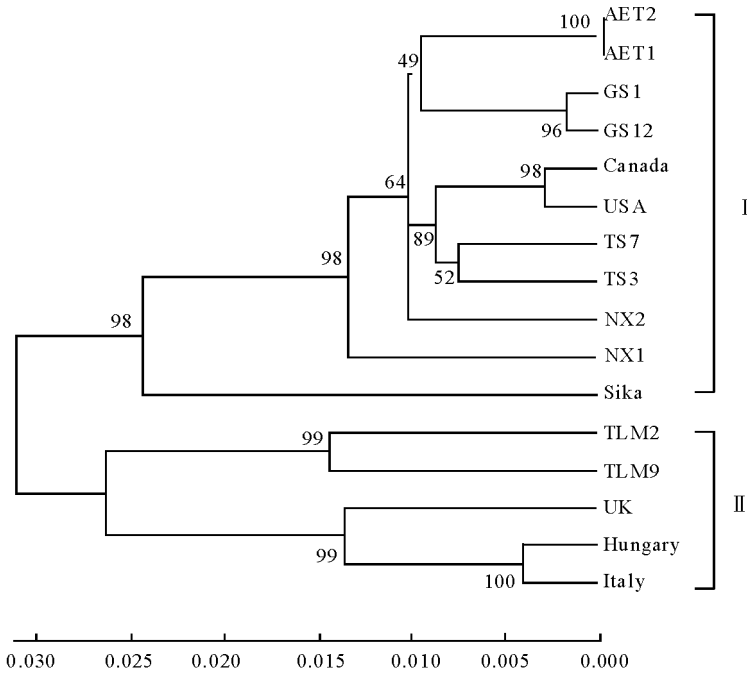


图 2 基于西北马鹿群体 D-loop 基因部分典型单倍型及 GenBank 中其他鹿种构建的 NJ 树
Fig.2 NJ tree of some typical haplotypes of deer populations in northwest of China and others from GenBank based on mtDNA D-loop gene

本研究中,各马鹿群体间均存在基因交流情况,阿尔泰马鹿、天山马鹿及甘肃马鹿中有部分单倍型与群体中其他单倍型差异非常大,以至于在建树过程中与其他群体聚为一类。例如,阿尔泰马鹿 AET3 单倍型与塔里木马鹿的 TLM1 完全一致;天山马鹿中 TS1 和甘肃马鹿聚为一类,TS2、TS4 与阿尔泰马鹿遗传关系更为接近;甘肃马鹿中 GS9 则聚入天山马鹿一支。以上情况反映出西北部分马鹿群体受到了其他马鹿的入侵,这与王洪亮等^[6]的部分研究结果相同,这可能与样本来源于人工养殖群体,存在群体间的引种杂交问题有关。本研究结果提示,有必要加强对不同马鹿群体的保护力度,适当控制马鹿群体间的混杂,以保持马鹿各群体的遗传多样性。

[参考文献]

[1] 盛和林. 中国鹿科动物 [J]. 生物学通报,1992(5):6-8.
Sheng H L. Cervidae animal in China [J]. Biology Bulletin, 1992(5):6-8. (in Chinese)

[2] 侯扶江,常生华,于应文. 我国鹿况简介 [J]. 草业科学,2003 (11):47-50.
Hou F J, Chang S H, Yu Y W. Brief introduction to deer in China [J]. Pratacultural Science, 2003 (11): 47-50. (in Chinese)

[3] 马逸清,赵裕方,于月明. 马鹿的生物学特性和亚种分类 [J].

国土与资源研究,1998(1):63-66.

Ma Y Q, Zhao Y F, Yu Y M. The biological characteristics of red deer and subspecies classification [J]. Land and Resources Research,1998(1):63-66. (in Chinese)

[4] 李明,王小明,盛和林,等. 马鹿四个亚种的起源和遗传分化研究 [J]. 动物学研究,1998,19(3):177-183.
Li M, Wang X M, Sheng H L, et al. Origin and genetic differentiation study for four sub-species of wapiti [J]. Zoological Research,1998,19(3):177-183. (in Chinese)

[5] 邢秀梅,杨福合,苏伟林,等. 马鹿线粒体 DNA 序列多态性分析 [J]. 吉林农业大学学报,2006,28(3):326-329.
Xing X M, Yang F H, Su W L, et al. Analysis of the genetic diversity of wapiti [J]. Journal of Jilin Agricultural University, 2006,28(3):326-329. (in Chinese)

[6] 王洪亮,任战军,王乐,等. 新疆马鹿群体的系统发育 [J]. 西北农业学报,2008,17(5):25-29.
Wang H L, Ren Z J, Wang L, et al. Molecular phylogeny of wapiti (red deer) populations in Xinjiang [J]. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica,2008,17(5):25-29. (in Chinese)

[7] 贾斌,张苏云,王建华,等. 利用微卫星标记分析新疆天山马鹿 3 个群体的遗传多样性 [J]. 草食家畜(季刊),2006(2):17-20.
Jia B, Zhang S Y, Wang J H, et al. Microsatellite analysis of genetic diversity of three *Cervus elaphus songaricus* colony in Xinjiang [J]. Grass-Feeding Livestock, 2006 (2): 17-20. (in Chinese)