

小麂、赤麂、黑麂 mtDNA 序列变异性及反映的进化关系*

单祥年^{①②} 施燕峰^① 张海军^① 徐春宏^① 李健^① 郑爱玲^①

(^①东南大学基础医学院遗传中心 南京 210009; ^②南京师范大学生命科学院 南京 210097)

摘要: 利用已测定的鹿科麂亚科动物小麂、赤麂、黑麂的线粒体全基因组序列,统计它们各自连接在一起的13个蛋白编码基因、22个tRNA基因、2个rRNA基因和1个控制区序列的碱基长度和组成,计算rRNA基因遗传距离,估算分歧时间,比较蛋白编码基因的碱基水平和氨基酸水平上的差异,基于连接在一起的13个氨基酸序列,以羊为外群,通过邻位相连法和最大简约性法构建进化树,探讨小麂、赤麂、黑麂的进化关系。结果表明,小麂是较原始的物种,赤麂和黑麂较为近缘,是从类似小麂的祖先演化而来。

关键词: 麂亚科;线粒体基因组;进化关系

中图分类号: Q347 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2004)04-35-05

mtDNA Sequences Variability of *Muntiacus reevesi*, *M. muntjak* and *M. crinifrons* as well as the Related Phylogenetic Relationship

SHAN Xiang-Nian^{①②} SHI Yan-Feng^① ZHANG Hai-Jun^① XU Chun-Hong^①
LI Jian^① ZHENG Ai-Ling^①

(^①Genetics Research Center, School of Basic Medicine, Southeast University, Nanjing 210009;

^②College of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

Abstract: Using the mitochondrial genomes of the *Muntiacus reevesi*, *M. muntjak* and *M. crinifrons* sequenced by our lab, we calculated the sequence lengths and base compositions of their individual concatenated sequences of 13 protein-coding genes, 22 tRNA genes, 2 rRNA genes and their control regions. The genetic distances based on the rRNA genes were calculated and their divergence time was estimated. The differences between the protein-coding genes and between the amino acid sequences were also compared. The phylogenetic tree was constructed with Neighbor-Joining method and Maximum-Parsimony method based on the concatenated amino acid sequences and the mtDNA sequence of *O. aries* in order to discuss their phylogenetic relationships. The results show that *M. reevesi* is more antique than *M. muntjak* and *M. crinifrons*. *M. muntjak* and *M. crinifrons* were diverged from an ancestor analogized with *M. reevesi*.

Key words: Muntiacinae; Mitochondrial genome; Phylogenetic relationship

鹿科麂亚科(Muntiacinae)动物^[1]小麂(*Muntiacus reevesi*) (2n = 46)、赤麂(*M. muntjak*) (2n = 6♀, 7♂, 表示雌性为6条染色体, 雄性为7条染色体, 下同)、黑麂(*M. crinifrons*) (2n = 8♀, 9♂)、费氏麂(*M. feae*) (2n = 14♀, 15♂)、罗氏麂(*M. rooseveltorum*) (2n = 6♀)以

及贡山麂(*M. gongshanensis*) (2n = 8♀, 9♂)的

* 国家自然科学基金资助项目(No. 3997011);

第一作者介绍 单祥年,男,67岁,教授,博导;研究方向:分子遗传学;E-mail: njxsn@yahoo.com.cn.

收稿日期:2003-09-1,修回日期:2004-05-20

进化关系一直是有争论的问题,在整个哺乳类性染色体进化是从 X1X1X2X2 ~ X1X2Y 到 XX ~ XY1Y2,最后进化到高等哺乳动物的 XX ~ XY 形式,王宗仁等^[2]认为黑麂是较原始的物种,小麂是较晚分化出来的物种,而兰宏等^[3]认为染色体数目较多的小麂是比较原始的物种,染色体较少的黑麂和赤麂是从类似小麂的祖先演化而来的。但 Geist^[4]指出,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的变化而呈现出很大的差异,而染色体组型仅仅是物种的特征之一,单凭这些分析物种的亲缘关系还是远远不够的。

哺乳动物线粒体 DNA(mtDNA)是共价闭环环状双链 DNA,大小为 16.5 kb 左右,每个细胞中有 1 000 ~ 10 000 个拷贝^[5]。线粒体 DNA 基因组结构简单稳定,属母系遗传,缺乏重组,其 DNA 变化主要来源于突变而非重组,因而通过对线粒体 DNA 的差异可以忠实的再现哺乳动物的母系进化史^[6],同时随着分子生物学和计算机技术的发展,大片断测序和序列分析已不再困难,所以利用线粒体序列研究进化关系的方法得到越来越多研究者的青睐。易广才等^[7]利用线粒体 12S rRNA、细胞色素 *b* 基因和多药耐药基因序列分析小麂、赤麂和黑麂的进化关系,认为赤麂是较原始的物种,小麂和黑麂是较新的物种。但由于分析的基因片断较短(1 503 bp 左右),提供的信息量有限,得出的结论是初步的,如要得出更准确的结论还需要更多的线粒体 DNA 序列信息^[8,9]。

基于此,作者利用本实验室测定的鹿科麂亚科动物小麂、赤麂、黑麂的线粒体全基因组序列,采用目前国际上较为公认的方法构建进化树,探讨小麂、赤麂、黑麂的进化关系,为麂亚科动物资源保护提供基础资料。

1 材料与方 法

1.1 实验材料 小麂是黄山猎户捕获的猎物,赤麂和黑麂细胞株购自中科院昆明动物研究所细胞库。

1.2 全序列测定 小麂的线粒体基因组采用鸟枪法测序策略,赤麂和黑麂线粒体基因组参考小麂线粒体基因组设计重叠扩增引物,PCR 扩增后测序(另文发表)。序列已递交 GenBank,登录号分别为:*M. reevesi* NC_004069、*M. muntjak* NC_004563 和 *M. crinifrons* NC_004577。

1.3 数据分析 将它们各自的 13 个蛋白编码基因、22 个 tRNA 基因、2 个 rRNA 基因和 1 个控制区分别连接成一个单独的序列, DNASTar-EditSeq 软件统计这些序列和控制区的碱基长度和碱基组成差异, Mega 软件^[10] Kimura 双参数模型^[11] 计算它们的 13 种蛋白编码基因的核苷酸序列间差异,用 DNASTar-MegAlign 软件 Clustal W 算法计算氨基酸序列间的差异,分析 13 个蛋白编码基因之间变异大小,同时以 Mega 软件 Kimura 双参数模型计算基于 12S rRNA 和 16S rRNA 的遗传距离和估算分歧时间。

Clustal X 软件对它们各自连接在一起的 13 个蛋白编码基因的氨基酸排序,由于鹿科中目前只有小麂、赤麂和黑麂的线粒体线粒体全序列,作者以羊(*O. aries* NC_001941)^[12,13] 为外群,通过邻位相连法^[14](Neighbor-Joining method) P-distances 参数模型和最大简约性法(Maximum-Parsimony method)^[15] 构建进化树,系统树各分支置信度由 Bootstrap 法检验,共 2 000 次循环,根据进化树讨论小麂、赤麂、黑麂的进化关系。其它未提及的程序设置为系统默认值。

2 结 果

2.1 线粒体碱基组成特点 从表 1 中可以看出小麂、赤麂和黑麂的线粒体结构的序列长度和碱基组成都非常接近,其中蛋白编码基因间的差异最小,而控制区序列的差异最大,A + T 含量大于 G + C,在 59.6% ~ 63.88% 之间,这些特征都与其它哺乳动物一致,显示哺乳动物线粒体基因组序列的稳定性^[16]。

2.2 蛋白编码基因序列比较 蛋白编码基因常用来分析种群关系,所以列出了 13 个蛋白编码基因和它们的编码蛋白氨基酸序列进行两两

表 1 小麂、赤麂和黑麂的线粒体碱基组成特点

物种	L 链		13 个蛋白编码基因		22 个 tRNA		2 个 rRNA		控制区	
	长度(bp)	A + T 含量	长度(bp)	A + T 含量	长度(bp)	A + T 含量	长度(bp)	A + T 含量	长度(bp)	A + T 含量
小麂 <i>M. reevesi</i>	16 354	62.15	11 406	62.04	1 523	63.62	2 526	62.43	920	60.98
赤麂 <i>M. muntjak</i>	16 354	62.15	11 406	61.93	1 517	63.88	2 523	62.86	912	60.64
黑麂 <i>M. crinifrons</i>	16 357	61.90	11 406	61.81	1 518	63.50	2 524	62.32	924	59.96

表 2 小麂、赤麂和黑麂线粒体的蛋白编码基因比较

基因	核苷酸序列差异			氨基酸序列差异		
	小麂/赤麂	小麂/黑麂	赤麂/黑麂	小麂/赤麂	小麂/黑麂	赤麂/黑麂
ND1	0.060(12)	0.059(10/11)	0.054(10)	0.019(5)	0.013(7)	0.013(7)
ND2	0.074(6/7)	0.078(4)	0.063(5)	0.015(6)	0.015(6)	0.009(9)
COX I	0.061(11)	0.070(7/8)	0.049(12/13)	0.000(12/13)	0.002(12)	0.002(12)
COX II	0.070(8)	0.070(7/8)	0.049(12/13)	0.009(8/9)	0.004(11)	0.004(11)
ATPase8	0.085(4)	0.086(1)	0.075(1)	0.115(1)	0.097(1)	0.063(1)
ATPase6	0.064(10)	0.059(10/11)	0.057(8/9)	0.009(8/9)	0.018(5)	0.018(5/6)
COX III	0.069(9)	0.056(12/13)	0.069(4)	0.008(10)	0.012(8)	0.012(8)
ND3	0.091(2)	0.081(3)	0.058(7)	0.027(4)	0.009(9)	0.018(5/6)
ND4L	0.088(3)	0.072(6)	0.057(8/9)	0.000(12/13)	0.000(13)	0.000(13)
ND4	0.077(5)	0.082(2)	0.071(2)	0.029(3)	0.033(3)	0.022(3)
ND5	0.093(1)	0.075(5)	0.070(3)	0.064(2)	0.041(2)	0.046(2)
ND6	0.052(13)	0.056(12/13)	0.052(11)	0.006(11)	0.006(10)	0.006(10)
Cyt b	0.074(6/7)	0.069(9)	0.059(6)	0.013(7)	0.030(4)	0.019(4)
Mean	0.074	0.070	0.060	0.024	0.022	0.018

括号内排序为序列差异的降序

比较,并按差异大小排序^[17](表 2),核苷酸序列差异从最小 4.9%(赤麂/黑麂-COX I 和 COX II)到最大 9.3%(小麂/赤麂-ND5),氨基酸序列差异从最小 0 到最大 11.5%(小麂/赤麂-ATPase8),核苷酸序列差异 > 氨基酸序列差异,核苷酸序列平均差异和氨基酸平均序列差异最小在黑麂和赤麂之间,分别为 6.0% 和 1.8%,平均差异最大值在小麂和赤麂之间,分别为 7.4% 和 2.4%。总体差异赤麂/黑麂 < 小麂/黑麂 < 小麂/赤麂,这意味着赤麂和黑麂的种群关系最为密切。细胞色素氧化酶亚基(COX I、COX II、COX III)是最为保守的基因,ATPase8、ATPase6、ND5 和 ND4 相对变异较大,ATPase8 是 13 个蛋白编码基因氨基酸序列变异最大的,最高达 11.5%(小麂/赤麂),小麂、赤麂和黑麂的 ATPase8 的 201 个核苷酸序列中出现了 18 处 23 个碱基突变,由于存在同义突变,没有造成氨基酸链的变化,因而 66 个氨基酸序列中只有 8 处氨基酸的变异(序列比对图略)。

2.3 rRNA 遗传距离与分歧时间 除蛋白编码基因外,12S rRNA 和 16S rRNA 也是研究物种间种群进化关系的重要手段^[18],以连接在一起的 rRNA 基因用 Clustal X 和 MEGA 计算它们的遗传距离,并用“每百万年线粒体碱基取代率为 2%”^[17,19]假定估计其分歧时间,由表 3 可看出赤麂和黑麂分歧时间较小,也就是说它们较为近缘。

表 3 基于 rRNA 基因的小麂、赤麂和黑麂遗传距离(左下角)和分歧时间(右上角,单位为百万年)

物种	小麂	赤麂	黑麂
	<i>M. reevesi</i>	<i>M. muntjak</i>	<i>M. crinifrons</i>
小麂 <i>M. reevesi</i>		2.00	1.70
赤麂 <i>M. muntjak</i>	0.040		1.55
黑麂 <i>M. crinifrons</i>	0.034	0.031	

2.4 进化分析 以羊为外群,基于连接在一起的 13 个蛋白编码基因的氨基酸序列,通过邻位相连法 P-distances 参数模型和最大简约性法构建进化树,系统树各分支置信度由 Bootstrap 法

2 000 次循环检验。在任何分析中 bootstrap 值小于 50% 的进化支持都需谨慎对待, 只有在 bootstrap 值大于 70% 时, 该进化枝才比较可信^[20]。其数值越高, 支持率越高, 树的置信度越高。从新构建的进化树(图 1)中可以看出邻位相连法和最大简约性法得到的结果一致, 赤鹿和黑鹿聚为一枝, 然后小鹿进化枝汇合, bootstrap 值邻位相连法为 98%、最大简约性法为 97%, 结果可信, 由此可以认为小鹿是较原始的物种, 赤鹿和黑鹿较为近缘, 是从类似小鹿的祖先演化而来。



图 1 基于连接的蛋白编码基因的氨基酸序列 NJ 法和 MP 法构建的进化树

枝长代表分歧度, 枝上的数字代表 bootstrap 2 000 次的支持率

3 讨论

限制性片断长度多态性(RFLP)方法的结论^[3]是小鹿、赤鹿和黑鹿的亲缘关系比较复杂, 但倾向于认为小鹿最原始。分支分类学方法研究^[21]也认为小鹿比较原始, 而黑鹿是小鹿分支中的近缘种。古生物学研究认为^[22]鹿亚科形成大致时间为中新世的后半期, 即中新世的中期和晚期, 其现有物种则认为是出现在更新世, 小鹿的化石最早发现在更新世, 距今约 3 百万年, 赤鹿化石发现在晚更新世, 距今约 50 万年, 因而认为小鹿较为原始。本文的结论基本与以上观点相符, 但线粒体 DNA 进化速率常因不同类群而有较大的差异, 2% 的标准假设推算出的结果可能会有一定的误差。

近年来又有一些学者利用 *Cytb*、12S rRNA 等对鹿亚科动物的种群关系进行了研究, 但由于只是线粒体基因组序列的一部分, 信息量太少, 得出的结论也只是初步的。在利用基因序

列比较构建基因树或者系统树的同时, 应该采用全基因序列或更多的序列资料, 以防止由部分序列变异的不均衡性造成的假象而提供错误的信息。随着研究的深入, 以 mtDNA 中完整的基因序列或多个基因序列协同而获得遗传信息来探讨物种的系统发育, 将是今后研究的发展方向^[23]。基于此作者测定了它们的线粒体全基因组, 但并没有用全基因组来构建进化树, 因为有些序列并不能反映物种的进化关系, 反而会钝化其它序列的进化分析, 所以选择目前国际上较为常用的方法, 将它们的线粒体所编码的氨基酸序列连接起来构建进化树^[24], 这种方法在其它哺乳动物的分析中已经得到广泛应用, 但在鹿科动物的系统发育分析中尚属首次。本文构建的进化树有较高的置信度, 认为小鹿是较原始的物种, 赤鹿和黑鹿较为近缘。

另外, 构建进化树的软件和算法有很多, 由于适用范围和个人喜好的不同, 很难有一个标准作为参考, 因此为了提高准确性, 本文采用了邻位相连法和最大简约性法, 它们又分别属于独立元素法和距离依靠法两类算法, 以期望可以弥补主观和客观算法上的缺陷^[25,26]。

致谢 衷心感谢中国科学院北京基因组研究所杨焕明教授和东南大学基础医学院遗传中心各位同仁给予的帮助和支持, 谨致谢意!

参 考 文 献

- [1] 曹祥荣, 束峰珏, 张锡然等. 毛冠鹿与 3 种鹿属动物的线粒体细胞色素 *b* 的系统进化分析. 动物学报, 2002, 48(1): 44 ~ 49.
- [2] 王宗仁, 杜若甫. 鹿科动物的染色体组型及其进化. 动物学报, 1983, 29(3): 214 ~ 221.
- [3] 兰宏, 施立明. 鹿属 (*Muntiacus*) 动物线粒体 DNA 多态性及遗传分化. 中国科学(B 辑), 1993, 23(5): 489 ~ 497.
- [4] Geist V. Endangered species and the law. *Nature*, 1992, 357: 274 ~ 276.
- [5] Anderson S, Bankier A T, Barrell B G, et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* (London), 1981, 290: 457 ~ 465.
- [6] Avise J C, Arnold J, Ball R M, et al. Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between

- population genetics and systematics. *Annu Rev Ecol Syst*, 1987, **18**: 489 ~ 522.
- [7] 易广才, 张晓梅, 单祥年. 鹿属 (*Muntiacus*) 动物线粒体 12S rRNA、细胞色素 *b* 基因和多药耐药基序列分析及其分子进化关系. 遗传学报, 2002, **29**(8): 674 ~ 680.
- [8] Arnason U, Johnsson E. The complete mitochondrial DNA sequence of the harbor seal. *Phoca vitulina*. *J Mol Evol*, 1992, **34**: 493 ~ 505.
- [9] Cao Y J, Adachi J, Janke A, et al. Phylogenetic relationships among eutherian orders estimated from inferred sequences of mitochondrial proteins: Instability of tree based on a single gene. *J Mol Evol*, 1994, **39**: 519 ~ 517.
- [10] Kumar S K, Tamura K, Nei M. MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis, Version 1. 01. Pennsylvania: Pennsylvania State University Press, USA, 1993.
- [11] Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol*, 1980, **16**: 9350 ~ 9354.
- [12] Hiendleder S, Lewalski H, Wassmuth R, et al. The complete mitochondrial DNA sequence of the domestic sheep (*Ovis aries*) and comparison with the other major ovine haplotype. *J Mol Evol*, 1998, **47**(4): 441 ~ 448.
- [13] Polzheim P O, Strobeck C. Phylogeny of Wapiti, Red Deer, Sika Deer, and other North American Cervids as determined from mitochondrial DNA. *Mol Phylogenet Evol*, 1998, **10**: 249 ~ 258.
- [14] Saitou N, Nei M. The Neighbor-Joining Method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 1987, **4**: 406 ~ 425.
- [15] 李衍达, 孙之荣. 生物信息学基因和蛋白质的实用指南. 北京: 北京大学出版社, 2000, 175 ~ 208.
- [16] Lin C S, Sun Y L, Liu C Y, et al. Complete nucleotide sequence of pig (*Sus scrofa*) mitochondrial genome and dating evolutionary divergence within Artiodactyla. *Gene*, 1999, **236**: 107 ~ 114.
- [17] Irwin D M, Kocher T D, Wilson A C. Evolution of the cytochrome *b* gene of mammals. *J Mol Evol*, 1991, **32**: 128 ~ 144.
- [18] Miyamoto M M, Kraus F, Ryder O A. Phylogeny and evolution of antlered deer determined from mitochondrial DNA sequences. *Proc Natl Acad Sci*, 1990, **87**: 6127 ~ 6131.
- [19] Meyer A C, Wilson A C. Origin of tetrapodes inferred from their mitochondrial DNA affiliation to lungfish. *J Mol Evol*, 1990, **31**: 359 ~ 364.
- [20] Kimball R T, Braun E L, Zwartjes P W, et al. A molecular phylogeny of the pheasants and partridges suggests that these lineages are not monophyletic. *Mol Phylogenet Evol*, 1999, **11**: 38 ~ 54.
- [21] 马世来, 王应祥, 徐龙辉. 鹿属 (*Muntiacus*) 的分类及其系统发育研究. 兽类学报, 1986, **6**(3): 191 ~ 209.
- [22] 费辽罗夫 K K. 鹿总科在其进化过程中的形态学和生态学. 古生物译报, 1957, **1** ~ **2**: 2 ~ 16.
- [23] 李庆伟, 田春宇, 李爽. 鹰科四种鸟类线粒体 DNA 的差异和分子进化关系的研究. 遗传, 2001, **23**(6): 529 ~ 534.
- [24] Kim K S, Lee S E, Jeong H W, et al. The complete nucleotide sequence of the domestic dog (*Canis familiaris*) mitochondrial genome. *Mol Phylogenet Evol*, 1998, **10**: 210 ~ 220.
- [25] Felsenstein J. Phylogenies from molecular sequences: inference and reliability. *Annu Rev Genet*, 1988, **22**: 521 ~ 565.
- [26] Kim J, Rolf F J, Sokal R R. Improving the accuracy of phylogenetic estimation by combining different methods. *Syst Biol*, 1993, **42**: 331 ~ 340.