

# 黑琴鸡北方亚种 mtDNA D-loop 遗传多样性初步研究

徐秀丽 蔡晓淇 白素英\*

东北林业大学野生动物资源学院 哈尔滨 150040

**摘要:** 黑琴鸡 (*Tetrao tetrix*) 为国家 II 级保护动物, 但近年来种群数量不断减少。因此, 了解不同种群的遗传变异情况, 可为制定保护管理策略提供依据, 以便恢复野外种群的数量。本文测定加格达奇 (42 个个体) 和呼伦贝尔市扎兰屯 (76 个个体) 两个黑琴鸡种群的共 118 个个体的 mtDNA D-loop 序列, 共发现 25 个变异位点, 定义了 33 个单倍型, 整体的平均核苷酸差异数 ( $K$ ) 为 2.608, 核苷酸多样性 ( $\pi$ ) 为 0.228%, 种群的遗传多样性偏低, 两个种群有一定的基因交流,  $N_m$  为 14.63, 群体间无显著的遗传分化。Tajima's  $D$  和 Fu & Li's  $D$  的估算结果表明, 这两个黑琴鸡种群相对于中性的歧异度并没有明显的偏离 ( $P > 0.1$ ), 两个种群可能未经过大规模的种群扩张过程。

**关键词:** 黑琴鸡; mtDNA D-loop; 遗传多样性

中图分类号: Q951 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263(2013)05-673-07

## Genetic Diversity of the Black Grouse *Tetrao tetrix baikalensis* at Daxinganling Based on the mtDNA D-loop Sequences

XU Xiu-Li CAI Xiao-Qi BAI Su-Ying\*

College of Wildlife Resources, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

**Abstract:** The Black Grouse (*Tetrao tetrix*) is one of the class II national protected birds in China, and its population is declining in recent years. To understand the difference of genetic variation among populations can provide basic knowledge for the conservation of endangered species, and help to develop management strategies. The genetic diversity of two Black Grouse (*T. t. baikalensis*) populations at Jagdaqi and Zhalantun, Daxinganling of northeast China were analyzed by the polymorphism of mtDNA D-loop sequences. 118 complete sequences were determined using DNA sequencing technology. 25 polymorphic sites, and 33 haplotypes were defined, of which 4 haplotypes were shared between two populations. The nucleotide diversity ( $\pi$ ) of Black Grouse in Jagdaqi and Zhalantun populations were 0.279% and 0.191% respectively, with higher polymorphism in Jagdaqi population. The average number of nucleotide difference ( $K$ ) and the nucleotide diversity ( $\pi$ ) were 2.608 and 0.228% in integral population. There was gene exchange between the two populations ( $N_m = 14.63$ ), and their genetic divergence was not significant. The estimate of Tajima's  $D$  and Fu & Li's  $D$  didn't deviate significantly from the neutral selection hypothesis ( $P > 0.1$ ) for the two populations, suggesting that they might not have been large-scale population expansion process.

**基金项目** 中央高校基本科研业务费专项 (No. DL09CA01), 国家实验教学示范中心建设专项;

\* 通讯作者, E-mail: syb01@163.com;

**第一作者介绍** 徐秀丽, 女, 硕士研究生; 研究方向: 动物种质资源保护; E-mail: xuxiuli0105@qq.com。

收稿日期: 2013-06-08, 修回日期: 2013-08-29

**Key words:** Black Grouse (*Tetrao tetrix*); mtDNA D-loop; Genetic diversity

黑琴鸡 (*Tetrao tetrix*) 隶属于鸡形目 (Galliformes) 松鸡科 (Tetraonidae), 为国家 II 级重点保护野生动物, 中国濒危动物红皮书易危物种。黑琴鸡是一多型种, 广泛分布于欧亚大陆的森林和森林草原带。在其分布区内分化形成了 7 个亚种, 我国有 3 个亚种。东北亚种 (*T. t. ussuriensis*) 分布于我国的小兴安岭和长白山地区, 国外分布于朝鲜东北部和俄罗斯乌苏里边区; 北方亚种 (*T. t. baikalensis*) 分布于大兴安岭、根河、大黑河、呼伦贝尔、伊图里河以及河北的围场等地, 国外分布于贝加尔和蒙古的北部; 新疆亚种 (*T. t. mongolicus*) 分布于我国新疆塔城、喀什、天山、阿勒泰地区, 国外分布于俄罗斯阿尔泰地区及蒙古西北部。其余 4 个亚种分别是: 指名亚种 (*T. t. tetrix*) 分布于斯堪的纳维亚半岛到法国和西伯利亚的北部; 英国亚种 (*T. t. britannicus*) 分布于苏格兰和英格兰的北部; 俄罗斯亚种 (*T. t. viridana*) 分布于俄罗斯南部和西伯利亚南部; 西伯利亚亚种 (*T. t. tschusii*) 分布于西伯利亚南部 (张录强等 1999)。

黑琴鸡曾在我国有较大量的分布, 但由于近几十年来的猎捕及栖息环境的破坏, 导致我国黑琴鸡的种群数量明显减少, 由 1990 ~ 1995 年调查的 15 万只左右减少到了 2004 ~ 2006 年调查的 2.5 万只左右 (尹远新等 2009), 其种群下降速度是惊人的。尹远新等 (2009) 的调查研究表明, 黑琴鸡目前在我国部分地区出现了濒临灭绝的现象, 种群数量还有继续下降的趋势。黑琴鸡在内蒙古境内主要分布于扎兰屯、红花尔基和海拉尔等地, 分布面积为 50 000 km<sup>2</sup>, 数量约为 2 600 只, 在黑龙江省主要分布于呼中、齐齐哈尔和小兴安岭等地, 分布面积为 15 605 km<sup>2</sup>, 数量约为 9 000 只 (马福等 2009)。大兴安岭地区黑琴鸡种群数量约为 1 630 只, 栖息面积为 11 490 km<sup>2</sup> (贺福银等 2004)。为了黑琴鸡种群的保护和恢复, 对黑琴鸡的遗传多样性的研究也尤为重要。国外对黑琴鸡的种

群遗传学开展了研究 (Caizergues et al. 2003, Höglund et al. 2007, Larsson et al. 2008, Höglund et al. 2011), 结果均呈现出黑琴鸡种群数量减少和遗传多样性丢失的现象。

鸟类线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 具有母系遗传、多拷贝、多态性高等独有的一些特性。mtDNA 进化速率快, 约为单拷贝核 DNA 的 5 ~ 10 倍 (刘铸等 2009), 其中控制区 (D-loop) 是 mtDNA 分子中进化最快的一个区域, 比 mtDNA 中的其他区域快 3 ~ 5 倍 (陈晓芳等 2002), 已被广泛用于动物群体遗传多样性、群体遗传结构、系统进化等方面的研究 (傅衍等 2001, 包文斌等 2007, 刘铸等 2009)。目前国内对黑琴鸡的研究主要集中在生态学及地方种群遗传多样性方面 (曹栋等 2011)。本文测定了来自加格达奇和呼伦贝尔市扎兰屯两个地区共 118 个野生黑琴鸡北方亚种的 mtDNA D-loop 区全序列, 分析比较了这两个地区黑琴鸡种群的遗传变异水平, 为黑琴鸡的遗传资源保护提供科学依据。

## 1 材料与方法

**1.1 实验材料** 实验材料为国家林业局野生动植物检测中心所保存 (执法鉴定罚没、来源地明确) 的加格达奇地区 (JD, 42 个) 和呼伦贝尔市扎兰屯市 (ZT, 76 个) 的黑琴鸡肌肉样品。

**1.2 实验方法** 酚-氯仿法提取 DNA, 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测, -20℃ 保存。PCR 引物 (武玉珍等 2008) 为 gH1255: 5'-CAT CTT GGC ATC TTC AGT GCC-3', gL16750: 5'-AGG ACT ACG GCT TGA AAA GC-3', 扩增 D-loop 基因全序列。

反应体系总体积 30 μl: 10 × buffer 3 μl、dNTPs (各 2.0 mmol/L) 2 μl、上下游引物 (10 pmol/L) 各 0.6 μl、*Taq* DNA 聚合酶 0.3 μl (2.5 U/μl), 加去离子水补足。扩增条件: 95℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s, 55℃ 复性 30 s, 72℃ 延伸 45 s, 35 个循环; 72℃ 延伸

7 min。1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,合格的 PCR 产物送北京华大基因公司纯化回收,双向测序。

**1.3 序列分析** 测序结果用 Chromos 进行人工校对,校对后用 SeqMan 拼接。Clustal W 序列比对,应用 DNAsp v5(Librado et al. 2009)确定单倍型,计算单倍型间的核苷酸多态性、单倍型多态性,核苷酸歧点分布曲线和基因流,进行 Tajima's  $D$  (Tajima 1989) 和 Fu and Li's  $D$  (Fu 1997) 中性检验并计算种群间的分化水平。用 MEGA 4.0 (Tamura et al. 2007) 软件分析序列多态位点、核苷酸总变异位点、简约信息位点以及碱基组成,用 NETWORK4.5 绘制网络亲缘关系图。

## 2 结果分析

**2.1 单倍型碱基组成及变异** 获得黑琴鸡控制区序列 1 145 ~ 1 149 bp,并检测到 25 个变异位点,其中单一多态位点 3 个,简约信息位点 22 个;插入/缺失 5 个,存在 T/C 和 G/A 转换,没有颠换。T、C、A、G 的平均含量分别为 33.8%、26.2%、26.0% 和 14.0%,A + T 含量 (59.8%) 明显高于 G + C 含量 (40.2%)。

在测定的 118 个个体的 mtDNA D-loop 序列中,共发现了 33 种单倍型 (GenBank 登录号为 JX965014 ~ JX965046),其分布频率见表 1,其中 H1、H2、H7、H13 为两个地区黑琴鸡的共享单倍型。

**2.2 遗传多样性与遗传分化** 由表 2 的遗传变异参数可知,加格达奇种群的遗传多样性高于扎兰屯种群。两个种群间的核苷酸歧异度 ( $D_{xy}$ ) 为 0.003 24,种群间的分化水平 ( $F_{st}$ ) 为 0.016 81,群体间的基因流 ( $N_m$ ) 为 14.63 ( $P = 0.591 8$ ),表明这两个地理种群间无显著的遗传分化出现。

**2.3 种群历史动态分析** 核苷酸歧点 (mismatch) 分布曲线 (图 1) 均为不规则的多峰曲线,而非种群扩张的单峰曲线模式 (Rogers et al. 1992),另外,表 1 中加格达奇种群的 Tajima's  $D$  值为负值、Fu and Li's  $D$  值为正值,

差异均不显著 ( $P > 0.10$ ),扎兰屯种群 Tajima's  $D$  值和 Fu and Li's  $D$  值均不显著小于零,说明这两个种群可能未经历大规模的种群扩张过程。若两个地区的黑琴鸡作为一个大的种群, Tajima's  $D$  值和 Fu and Li's  $D$  值均不显著偏离零,也支持这一推测。

**2.4 单倍型间进化关系分析** 33 个单倍型的网络亲缘关系图 (图 2) 中两个种群的单倍型聚为两大簇, A 簇以扎兰屯的单倍型为主, B 簇以加格达奇的单倍型为主。

## 3 讨论

加格达奇与扎兰屯黑琴鸡的 mtDNA D-loop 序列中,碱基 T 的含量最高, G 的含量最低, A + T 的含量高于 G + C 的含量,表现出碱基组成的偏倚性,这与其他关于鸟类 mtDNA D-loop 的报道是一致的。在 25 个变异位点中, 3 个位点为转换,没有颠换,插入/缺失 5 个,在线粒体基因组 DNA 进化过程中,通常发生转换的频率高于颠换,在高突变的 D-loop 区也不例外,这与 mtDNA 进化的特点相一致 (Anderson et al. 1982)。

遗传多样性是衡量一物种抵制自然界各种生存压力的能力强弱的重要遗传学指标,多样性的降低将更容易导致物种的灭绝。衡量一个种群 mtDNA 遗传多样性有两个指标:一个是单倍型间的平均遗传距离 ( $P$ ),  $P$  值在 0.001 ~ 0.007 之间被认为缺乏变异指标范围;另一个是核苷酸多态性 ( $\pi$ ), 该值越小说明群体的遗传多样性越低,由于  $\pi$  值考虑了各种 mtDNA 单倍型在群体中所占的比例,因此在反应一个群体的 mtDNA 多态程度时比单纯的单倍型间的平均遗传距离 ( $P$  值) 更精确 (Drovetski 2002)。加格达奇种群的核苷酸多态性为 0.28%,扎兰屯种群为 0.19%,加格达奇种群黑琴鸡 mtDNA D-loop 多态性较扎兰屯种群的高。两地区黑琴鸡总的核苷酸多态性  $\pi$  为 0.23%,其核苷酸多态性较河北塞罕坝黑琴鸡种群的较高 (0.167%) (曹栋等 2011),但其 mtDNA 遗传多样性还是偏低的,并且多为低频



表 2 黑琴鸡线粒体 DNA 多样性  
Table 2 MtDNA diversity of *Tetrao tetrix*

参数 Parameters	种群 Population		合计 Total
	加格达奇 Jagdaqi JD	扎兰屯 Zhalantun ZT	
序列数 Number of sequences	42	76	118
单倍型数 Number of haplotype	18	19	33
突变数 Total number of mutations	17	17	25
单倍型多样性 Haplotype diversity ( $h$ )	0.890	0.831	0.900
核苷酸多样性 Nucleotide diversity ( $\pi$ ) (%)	0.279	0.191	0.228
平均核苷酸差异数 Average number of nucleotide difference	3.188	2.192	2.608
(G + C) 含量 (G + C) contents (%)	40.2	40.1	40.2
Tajima 检验 Tajima's $D$	-0.620 58	-1.078 73	-1.293 89
Fu and Li 检验 Fu and Li's $D$	0.416 54	-0.227 12	0.679 61

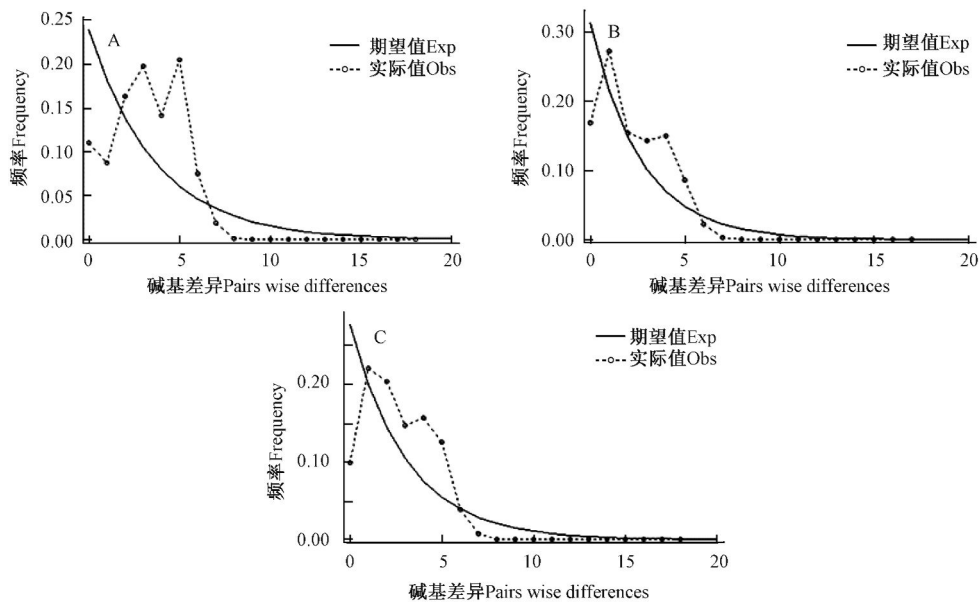


图 1 核苷酸歧点分布曲线图

Fig. 1 Distribution of the number of pairwise differences

A. 加格达奇种群; B. 扎兰屯种群; C. 整体。

A. The population of Jagdaqi; B. The population of Zhalantun; C. The total samples.

单倍型,更易造成单倍型的丢失。国外对黑琴鸡种群遗传多样性的研究主要是对微卫星 DNA 的分析,结果显示,英国境内的黑琴鸡种群正面临着分布范围的紧缩和种群数量减少的威胁,并呈现出种群遗传多样性丢失的现象 (Höglund et al. 2011);荷兰黑琴鸡种群等位基因丰富度减少和多样性降低的主要原因是种群隔离和种群数量的减少 (Larsson et al. 2008);生境破碎化导致了欧洲黑琴鸡种群遗传结构有

较高的分散倾向,并且独立种群较连续种群呈现低的遗传变异 (Caizergues et al. 2003, Höglund et al. 2007),这些研究结果在遗传多样性降低的趋势上同本文是相一致的。

Wright 认为群体间的基因流值若小于 1 ( $N_m < 1$ ),则表明有限的基因流是促使群体发生遗传分化的主要原因 (Neigel et al. 2002);  $N_m > 1$ ,说明地理距离很近或群体间有某种渠道可以发生基因交流 (曲若竹等 2004),遗传漂

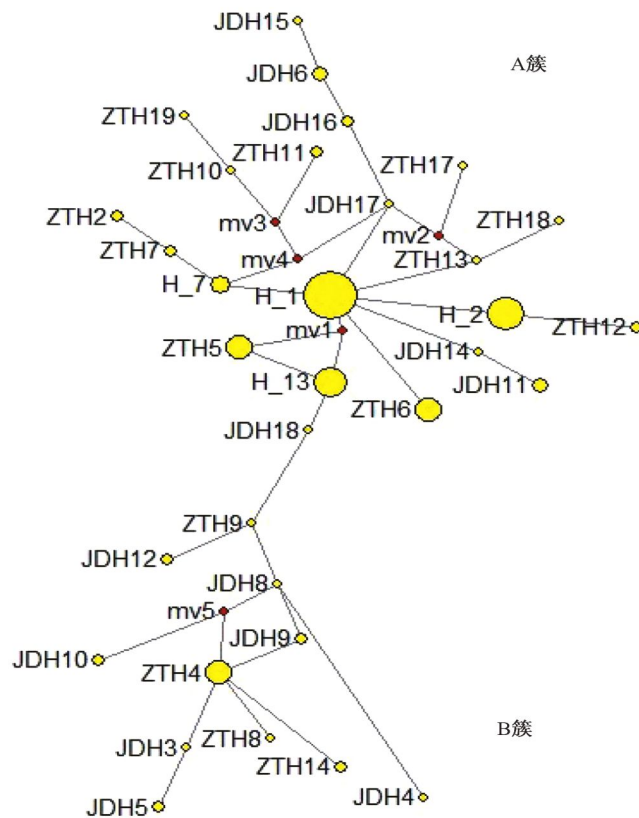


图2 33个单倍型间的网络亲缘关系图

Fig. 2 The median-joining networks of 33 mtDNA D-loop haplotypes

每个圆圈代表一种单倍型,其大小与该种单倍型出现的频率成正比,红点代表可能存在的变异位点。

A cycle mean a haplotype, the area means the frequency in a haplotype, the red means the potential mutation sites.

变不至于造成遗传分化(Slatkin 1987);  $N_m > 4$ , 表明群体间个体可以随机交配(Hartl et al. 2006)。本文中的两群体的  $N_m = 14.63$ , 在单倍型的网络亲缘关系图中, 33个单倍型聚为2个明显的分支, 表明此黑琴鸡群体可能由2个祖先母系进化而来, 但两个种群并没有显示出地理位置与单元型的对应关系, 而是相互交错相聚, 此外, 加格达奇与扎兰屯的地理位置较近(相距605 km), 没有地理隔离, 足以说明两群体确实存在基因交流, 无显著的遗传分化, 并没有形成地理种群或亚种。

黑琴鸡是森林生态系统质量的重要标志之一, 但目前资源储备下降严重。本研究显示其遗传多样性偏低, 且多为低频单倍型, 其遗传多样性易进一步降低。这两个种群有一定的基因

交流, 分化程度低, 建议引入遗传多样性丰富的、含有稀有基因的种群和个体作为亲本进行扩繁, 人为增加种群间的基因交流, 即可避免其遗传多样性的丧失, 又可恢复野外种群的规模。同时重点保护黑琴鸡栖息地的生态环境, 以利于种群的繁殖, 同时减少栖息地的破碎化, 防止由于生境片断化而产生的自交衰退等不利的遗传效应, 并完善保护区的职能, 加大巡护和反盗猎力度, 以减轻盗猎活动对黑琴鸡的威胁, 只有采取多种措施才能使黑琴鸡逐渐摆脱濒临灭绝的境地, 达到种群保护和恢复的目的。

参 考 文 献

Anderson S, De Bruijn M H L, Coulson A R, et al. 1982. Complete sequence of bovine mitochondrial DNA conserved features of the mammalian mitochondrial genome. Journal of

- Molecular Biology, 156(4): 683 – 717.
- Caigergues A, Rätti O, Helle P, et al. 2003. Population genetic structure of male black grouse (*Tetrao tetrix* L.) in fragmented vs. continuous landscapes. *Molecular Ecology*, 12(9): 2297 – 2305.
- Drovetski S V. 2002. Molecular phylogeny of grouse; individual and combined performance of W-linked, autosomal, and mitochondrial loci. *Systematic Biology*, 51(6): 930 – 945.
- Fu Y X. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 147(2): 915 – 925.
- Hartl D L, Clark A G. 2006. *Principles of Population Genetics*. 4th ed. Sunderland: Sinauer Associates, 1 – 565.
- Höglund J, Larsson J K, Corrales C, et al. 2011. Genetic structure among black grouse in Britain: implications for designing conservation units. *Animal Conservation*, 14(4): 400 – 408.
- Höglund J, Larsson J K, Jansman H A H, et al. 2007. Genetic variability in European black grouse (*Tetrao tetrix*). *Conservation Genetics*, 8(1): 239 – 243.
- Neigel J E. 2002. Is  $F_{ST}$  obsolete? *Conservation Genetics*, 3(2): 167 – 173.
- Larsson J K, Jansman H A H, Segelbacher G, et al. 2008. Genetic impoverishment of the black grouse (*Tetrao tetrix*) population in the Netherlands: detectable only with a reference from the past. *Molecular Ecology*, 17(8): 1897 – 1904.
- Librado P, Rozas J. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25(11): 1451 – 1452.
- Rogers A R, Harpending H. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution*, 9(3): 552 – 569.
- Slatkin M. 1987. Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science*, 236(4803): 787 – 792.
- Tajima F. 1989. Statistical method for test the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123(3): 585 – 595.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. 2007. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24(8): 1596 – 1599.
- 包文斌, 陈国宏, 吴信生, 等. 2007. 中国红原鸡和泰国红原鸡遗传多样性分析. *遗传*, 29(5): 587 – 592.
- 陈晓芳, 李爽, 王黎, 等. 2002. 鸟类线粒体 DNA 研究概述. *遗传*, 24(3): 371 – 375.
- 曹栋. 2011. 河北塞罕坝黑琴鸡的遗传多样性及与栖息地环境因子的相关性研究. 河北: 河北农业大学硕士学位论文, 21 – 23.
- 傅衍, 牛冬, 阮晖, 等. 2001. 浙江省地方鸡种的遗传多样性研究. *遗传学报*, 28(7): 606 – 613.
- 贺福银, 王建强, 田家龙, 等. 2004. 大兴安岭地区松鸡科鸟类. *中国林副特产*, 5(72): 42 – 43.
- 刘铸, 杨春文, 金建丽, 等. 2009. 鸟类线粒体 DNA 结构特点及在鸟类研究中的应用. *生物技术通报*, (12): 42 – 47.
- 马福, 张建龙, 等. 2009. 中国重点陆生野生动物资源调查. 北京: 中国林业出版社, 171 – 172.
- 曲若竹, 侯林, 吕红丽, 等. 2004. 群体遗传结构中的基因流. *遗传*, 26(3): 377 – 382.
- 武玉珍, 赵春贵, 王孟本, 等. 2008. 珍稀濒危鸟类褐马鸡 mtDNA 的分子克隆及序列分析. *山西大学学报: 自然科学版*, 31(1): 104 – 107.
- 尹远新, 田家龙. 2009. 我国黑琴鸡种群状况及其保护管理对策. *中国林副特产*, (1): 86 – 87.
- 张录强, 李春秋. 1999. 黑琴鸡 (*Lyrurus tetrix*) 生物学研究进展(I)——地理分布、亚种分化、食性、生境选择及其行为. *河北师范大学学报: 自然科学版*, 23(2): 542 – 544.