

两种鹤科动物 *MHC-I* 基因高变区的对比分析

刘宏毅^① 孙成贺^① 刘大伟^{①②③} 鲁长虎^① 吕士成^②

① 南京林业大学生物与环境学院 南京 210037; ② 江苏盐城国家级自然保护区管理处 盐城 224333;

③ 南京森林警察学院刑事科学技术学院 南京 210023

摘要: 主要组织相容性复合体 (*MHC*) 是脊椎动物基因组中高度多态的基因家族, 其编码产物在脊椎动物免疫系统中起着重要作用。受湿地生境污染和破坏等因素的影响, 全球现存鹤科 (*Gruidae*) 动物大都已处于受胁状态。为了解鹤科动物 *MHC-I* 基因序列信息, 本研究设计通用引物对灰鹤 (*Grus grus*) 和肉垂鹤 (*Bucconas carunculatus*) *MHC-I* 基因进行分离。结果从 1 只灰鹤和 1 只肉垂鹤血液基因组中分别分离到 2 条和 3 条长约 1 500 bp 的序列片段, 这暗示鹤科动物至少存在两个 *MHC-I* 基因座位。分离到的核苷酸序列均可翻译成正常的氨基酸, 表明它们具有一定的生物学功能。*MHC-I* 抗原结合区的核苷酸和氨基酸变异率, 灰鹤分别为 5.0% 和 9.6%, 肉垂鹤为 9.1% 和 14.6%。两种鹤抗原肽结合位点的非同义替代率与同义替代率的比值分别为 7.348 8 和 2.145 2, 表明其受到强烈的正选择作用。贝叶斯系统发生树显示, 鹤科动物 *MHC-I* 基因并未按物种聚类, 暗示 *MHC-I* 基因跨物种多态性的存在。本研究获得的 *MHC-I* 基因通用引物及序列信息, 可为今后濒危鹤科动物的保护遗传学研究奠定基础。

关键词: 鹤科动物; 灰鹤; 肉垂鹤; 主要组织相容性复合体; 保护遗传学

中图分类号: Q786 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2019) 04-567-09

Comparative Analysis of the Hypervariable Region of *MHC-I* Gene in Two Crane Species

LIU Hong-Yi^① SUN Cheng-He^① LIU Da-Wei^{①②③} LU Chang-Hu^① LÜ Shi-Cheng^②

① *College of Biology and the Environment, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037;*

② *Administration of Yancheng National Natural Reserve, Yancheng 224333;*

③ *Criminal Forensic Science Faculty, Nanjing Forest Police College, Nanjing 210023, China*

Abstract: Major histocompatibility complex (*MHC*) is a highly polymorphic gene family in the vertebrate genome, and its coding products play an important role in the vertebrate immune system. Most of the world's surviving crane (*Gruidae*) species are threatened due to habitat pollution and destruction. To understand the information of *MHC-I* sequences of cranes, universal primers were designed to isolate and clone *MHC-I*

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 31800453), 江苏省自然科学基金项目 (No. BK20160927);

第一作者简介 刘宏毅, 男, 博士; 研究方向: 保护遗传学; E-mail: hongyi_liu@njfu.edu.cn.

收稿日期: 2018-10-16, 修回日期: 2019-04-18 DOI: 10.13859/j.cjz.201904013

sequences from genomic DNA extractions from blood of a common crane (*Grus grus*) and a wattled crane (*Bugeranus carunculatus*) in captivity. Two and three sequences of 1 500 bp were isolated respectively from the genomes of *G. grus* and *B. carunculatus*, suggesting the existence of at least two *MHC-I* loci in cranes. All nucleotide sequences could be translated into normal amino acid sequences, indicating that they might execute certain functions (Fig. 1). The mutation rates of nucleotide and amino acid in the antigen binding region were 5.0%, 9.6% for *G. grus* and 9.1%, 14.6% for *B. carunculatus*, respectively (Table 2). The antigen binding sites were subject to strong positive selection, as the values of d_N/d_S were 7.348 8 and 2.145 2 for *G. grus* and *B. carunculatus*, respectively (Table 3). Bayesian trees showed that *MHC-I* sequences did not cluster according to crane species, indicating trans-species polymorphism of *MHC-I* genes in cranes (Fig. 2). The universal primers and sequences of *MHC-I* genes obtained here could lay a foundation for further study of conservation genetics of endangered cranes in the future.

Key words: Gruidae; *Grus grus*; *Bugeranus carunculatus*; Major histocompatibility complex; Conservation genetics

全球现存鹤科 (Gruidae) 动物共计 15 种, 分别隶属 4 属 2 亚科 (侯雨辰等 2015)。多数鹤科动物属于候鸟, 迁徙往返于不同地理纬度的湿地生境, 因此其所应对的环境因素较为复杂 (Jones et al. 2014)。因人类干扰活动加剧, 全球湿地生境不断减少和退化, 鹤科动物如今所要面对的环境压力日益增大。据 IUCN 统计, 多数鹤科动物的野生种群数量仍在减少, 目前被列为受威胁等级的鹤科动物多达 11 种 (<http://www.iucnredlist.org>)。

主要组织相容性复合体 (major histocompatibility complex, *MHC*) 是脊椎动物基因组中紧密连锁的基因家族, 其遗传变异水平与脊椎动物的疾病抵抗能力密切相关, 直接影响着个体乃至整个种群的适合度 (Sommer 2005, Minias et al. 2016)。*MHC* 基因的遗传变异水平已成为评估濒危野生动物适应进化潜力的重要指标 (Sommer 2005, 蓝泓 2014, Akiyama et al. 2017)。根据 *MHC* 分子呈递的抗原类型, 可将其分为 *MHC-I* 和 *MHC-II* 两个亚家族。*MHC-I* 经典分子参与内源性抗原的呈递, *MHC-II* 经典分子则与外源性抗原的呈递相关 (Minias et al. 2016)。两类 *MHC* 分子结构基本相似, 都是以非共价键形式结合而成的异源二聚体, 其间的抗原结合区是 *MHC* 分子多

态性最为丰富的区段 (蓝泓 2014)。

目前, 已有 13 种鹤的 *MHC-II* 基因结构及其进化关系得以揭示 (Kohyama et al. 2015)。鹤科动物基因组中至少存在两个 *MHC-II* 基因座位, 并呈现跨物种多态现象 (Kohyama et al. 2015)。*MHC-I* 基因的信息甚少, 仅沙丘鹤 (*Grus canadensis*) *MHC-I* 的 cDNA 序列 (Jarvi et al. 1999) 和丹顶鹤 (*G. japonensis*) *MHC-I* 外显子 3 部分片段 (Akiyama et al. 2017) 得以揭示。住白细胞虫病和球虫病是威胁鹤科动物健康的常见疾病 (Bennett et al. 1974, Matsubayashi et al. 2005)。对其他鸟类的研究表明, *MHC-I* 基因的遗传变异与这些疾病存在潜在关联 (Lillehoj et al. 1989, Rivero-de Aguilar et al. 2016)。*MHC-I* 分子的抗原结合区是由 *MHC-I* 基因的外显子 2 和外显子 3 序列编码的 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 结构域共同组成, 这两段外显子的变异均可能与疾病抵抗力存在关联 (蓝泓 2014, Zeng et al. 2016)。因此, 本研究将以亲缘关系较远的灰鹤 (*G. grus*) 和肉垂鹤 (*Bugeranus carunculatus*) 为研究对象, 克隆分离这两种鹤的 *MHC-I* 外显子高变区序列及邻近内含子序列, 并比较分析两种鹤 *MHC-I* 基因高变区的结构、变异情况及其系统发生关系。研究结果可丰富公共数据库资源, 为今后濒危鹤科动物 *MHC-I* 基因的多态

性研究奠定基础, 进而为其种群管理、适应性进化潜力评估提供理论依据, 对濒危鹤类的保护具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 研究材料

本研究所用实验材料包括 1 只灰鹤和 1 只肉垂鹤的全血样品。样品采自江苏盐城国家级珍禽自然保护区的圈养鹤。样品于兽医抽血体检时, 通过静脉采血法获取。收集的样品用抗凝管保存, 冻于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中。

1.2 研究方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 从抗凝管中取 $10\text{ }\mu\text{l}$ 全血移至 1.5 ml 离心管, 采用 DNAiso[宝日医生物技术(北京)有限公司]提取基因组 DNA。抽提结束后, 吸取 $2\text{ }\mu\text{l}$ DNA 用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测质量, 高质量基因组 DNA 用于后续实验。

1.2.2 PCR 扩增 根据沙丘鹤 (*Grca-UA* 序列号: AF033106.1)、东方白鹤 (*Cionia boyciana*, *Cibo-UA* 序列号: LC180358.1) 以及红腹滨鹬 (*Calidris canutus*, *Caca-UA*01* 序列号: KC205116.1) *MHC-I* 序列, 自行设计通用引物 MhcF (5'-CCA YTC CCT GCG STA CTT CTA-3') 和 MhcR (5'GGT GCC GTC GCT GTT GGG C-3') (其中, Y = C/T, S = C/G) 进行 PCR 扩增。PCR 反应所用试剂购自宝日医生物技术(北京)有限公司, 参照说明书配制反应 $50\text{ }\mu\text{l}$ 体系: LA *Taq* ($5\text{ U}/\mu\text{l}$) $0.5\text{ }\mu\text{l}$, $2\times\text{ GC Buffer I}$ $25\text{ }\mu\text{l}$, dNTP Mixture (2.5 mmol/L each) $8\text{ }\mu\text{l}$, DNA 模板 (0.25 g/L) $5\text{ }\mu\text{l}$, MhcF ($1\text{ }\mu\text{mol/L}$) $1.5\text{ }\mu\text{l}$, MhcR ($1\text{ }\mu\text{mol/L}$) $1.5\text{ }\mu\text{l}$, 超纯水 $8.5\text{ }\mu\text{l}$ 。PCR 反应程序如下: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min ; $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 35 s , $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 35 s , $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min , 35 个循环; 最后 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min 。PCR 反应结束后, 吸取 $2\text{ }\mu\text{l}$ 产物在 1% 琼脂糖凝胶上进行电泳检测。

1.2.3 克隆测序 剩余的 PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳分离后, 将目的片段从凝胶中切下,

用 DNA 凝胶回收试剂盒[宝日医生物技术(北京)有限公司]纯化回收。纯化后的 PCR 产物连接到 pMD18-T 载体[宝日医生物技术(北京)有限公司], 再转化至 DH5 α 感受态细胞, 涂板, 挑取单克隆后摇菌培养(培养条件: $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 300 r/min , 12 h)。用原引物和 M13 通用引物进行两次菌落 PCR, 以筛选阳性克隆。两种鹤分别挑取 10 个单克隆, 采用 M13 通用引物进行双向测序(擎科生物科技有限公司, 南京)。

1.2.4 数据分析 利用 LaserGene 7.0 软件剪裁、拼接测序获得的原始序列, 并辅以人工校对 (Burland 2000)。通过 GenBank 网站上的 Blast 工具进行序列对比, 以确定所得序列为目标基因。利用 DnaSP 6.0 软件统计序列的变异位点数 (Rozas et al. 2017)。根据朱鹮 (*Nipponia nippon*) *MHC-I* 分子抗原结合位点信息 (蓝泓 2014), 推测出两种鹤 *MHC-I* 分子抗原结合位点。用 Mega 7.0 软件计算序列的碱基组成, 并基于 Nei-Gojobori (Jukes-Cantor) 法计算同义替换率 (d_S)、非同义替换率 (d_N), 推算抗原肽结合位点、非抗原肽结合位点受到的选择压力 (Kumar et al. 2016)。判断标准如下: 当 $d_N/d_S > 1$ 时, 表明受正选择作用; 当 $d_N/d_S = 1$ 时, 表明受中性选择作用; 当 $d_N/d_S < 1$ 时, 表明受负选择作用 (Kumar et al. 2016)。从 GenBank 数据库下载沙丘鹤 (*Grca-UA* 序列号: AF033106.1)、丹顶鹤 (*Grja-UA*01* 序列号: LC132723.1, *Grja-UA*02* 序列号: LC132724.1, *Grja-UA*03* 序列号: LC132725.1, *Grja-UA*04* 序列号: LC132726.1, *Grja-UA*05* 序列号: LC132736.1)、东方白鹤 (*Cibo-UA* 序列号: LC180358.1)、红腹滨鹬 (*Caca-UA*01* 序列号: KC205116.1, *Caca-UA*02* 序列号: KC205117.1, *Caca-UA*03* 序列号: KC205118.1)、朱鹮 (*Nini-UA*01* 序列号: KP182418.1, *Nini-UA*02* 序列号: KP182419.1)、扬子鳄 (*Alligator sinensis*, *Alsi-UA* 序列号: XM_025194534.1) 的同源序列, 并在 MrBayes 3.2.6 软件中构建系统发生树 (Huelsenbeck et al. 2001), 以探讨

两种鹤科动物 *MHC-I* 基因的系统进化关系。

2 结果

2.1 *MHC-I* 基因的鉴定

利用通用引物扩增两种鹤的基因组 DNA 均能获得片段大小约 1 500 bp 的 PCR 产物。将产物克隆, 分别从灰鹤和肉垂鹤样品中分离到 2 条和 3 条不同的核苷酸序列。在 GenBank 数据库中比对发现, 分离到的序列与东方白鹤 (*Cibo-UA* 序列号: LC180358.1) *MHC-I* 基因序列相似度高达 80% 以上。基于东方白鹤 (*Cibo-UA* 序列号: LC180358.1) *MHC-I* 序列的区域划分信息, 进一步确定分离到的序列覆盖两种鹤科动物 *MHC-I* 基因的外显子 2 到外显子 4 区域。根据 *MHC-I* 基因序列的命名原则, 分别将灰鹤的 2 条 *MHC-I* 序列命名为 *Grgr-UA*01* (序列号: MK034099)、*Grgr-UA*02* (序列号: MK034100); 将肉垂鹤的 3 条 *MHC-I* 序列命名为 *Buca-UA*01* (序列号: MK034101)、*Buca-UA*02* (序列号: MK034102)、*Buca-UA*03* (序列号: MK034103)。

2.2 *MHC-I* 基因外显子 2 和 3 序列的特征

2.2.1 序列的碱基组成 裁去序列其他部分, 保留 536 bp 外显子 2 和 3 序列, 其中, 外显子

2 序列长 260 bp (缺少前端 4 个碱基), 外显子 3 序列长 276 bp, 序列间无缺失/插入现象。两种鹤科动物 *MHC-I* 基因外显子 2 和 3 区域的碱基组成差异不大, 且 G + C 含量显著高于 A + T 含量 (表 1)。

2.2.2 序列的变异 两种鹤的外显子 2 和 3 核苷酸序列间均存在大量的变异位点 (表 2)。种内高变区核苷酸的总变异率分别为 5.0% 和 9.1%, 且外显子 2 和外显子 3 序列间的核苷酸变异率相当, 灰鹤两个外显子的变异率分别为 5.0% 和 5.1%, 肉垂鹤两个外显子的变异率分别为 9.2% 和 9.1% (表 2, 图 1)。

因 *MHC-I* 基因从外显子 1 开始编码, 外显子 1 的碱基数通常非密码子整数倍, 同时本研究未获得完整外显子 2 序列。参照朱鹮 (序列号: KP182418.1)、东方白鹤 (序列号: LC180358.1) *MHC-I* 的翻译情况, 对 536 bp 序列再次进行编辑。裁剪掉外显子 2 第一个碱基和外显子 3 最后一个碱基后, 5 条核苷酸序列均能翻译成正常的氨基酸序列, 其间无缺失或终止 (图 1)。与核苷酸序列相对应, 蛋白序列间亦存在丰富的变异位点, 两种鹤种内高变区氨基酸的总变异率分别为 9.6% 和 14.6% (表 2, 图 1)。此外, 种内 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 结构域间的氨

表 1 两种鹤 *MHC-I* 基因外显子 2 和 3 的碱基组成

Table 1 Nucleotide composition of exons 2-3 of *MHC-I* genes in two kinds of cranes

物种 Species	胸腺嘧啶 (%) Thymine (%)	胞嘧啶 (%) Cytosine (%)	腺嘌呤 (%) Adenine (%)	鸟嘌呤 (%) Guanine (%)
灰鹤 <i>Grus grus</i>	15.7	26.3	23.1	34.9
肉垂鹤 <i>Bugeranus carunculatus</i>	15.8	25.6	23.8	34.8

表 2 两种鹤 *MHC-I* 基因外显子 2 和 3 的遗传变异

Table 2 Genetic variation of exons 2 and 3 of *MHC-I* genes in two kinds of cranes

物种 Species	核苷酸水平变异位点数及所占比例 Number of variable sites and its proportion at nucleotide level			氨基酸水平变异位点数及所占比例 Number of variable sites and its proportion at amino acid level		
	外显子 2 Exon 2	外显子 3 Exon 3	整体 Total	$\alpha 1$ 结构域 $\alpha 1$ domain	$\alpha 2$ 结构域 $\alpha 2$ domain	整体 Total
灰鹤 <i>Grus grus</i>	13 (5.0%)	14 (5.1%)	27 (5.0%)	8 (9.3%)	9 (9.8%)	17 (9.6%)
肉垂鹤 <i>Bugeranus carunculatus</i>	24 (9.2%)	25 (9.1%)	49 (9.1%)	13 (15.1%)	13 (14.1%)	26 (14.6%)

氨基酸变异率相当, 灰鹤两个结构域的变异率分别为 9.3%和 9.8%, 肉垂鹤两个结构域的变异率分别为 15.1%和 14.1% (表 2, 图 1)。

2.3 *MHC-I* 基因受到的自然选择

两种鹤 *MHC-I* 基因抗原结合区共有 37 个抗原肽结合位点, 其中抗原主链肽结合位点 8 个, 其余抗原肽结合位点 29 个 (图 1)。抗原

肽结合位点和非抗原肽结合位点间呈现出差异性自然选择方式 (表 3)。两种鹤抗原肽结合位点的 d_N/d_S 值分别为 7.348 8 和 2.145 2, 而非抗原肽结合位点的 d_N/d_S 值分别为 0.466 0 和 0.360 6, 表明抗原肽结合位点均受到正选择作用, 而非抗原肽结合位点则受到负选择作用 (表 3)。

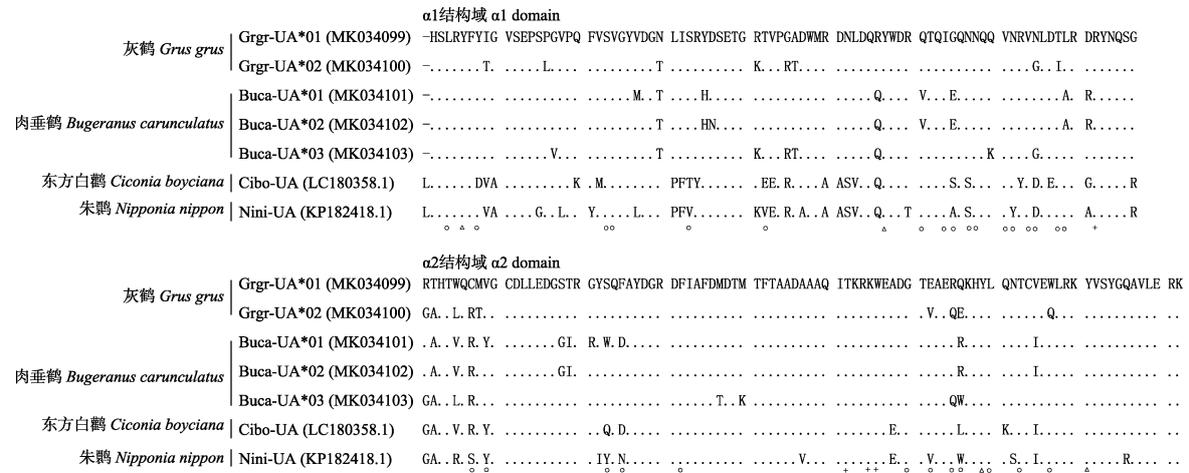


图 1 *MHC-I* 分子抗原结合区氨基酸序列对比

Fig. 1 Alignment of the amino acid sequences for antigen binding region of *MHC-I* molecules

Grgr-UA、Buca-UA、Cibo-UA 和 Nini-UA 分别代表灰鹤、肉垂鹤、东方白鹤和朱鹤 *MHC-I* 序列。“.”代表相同氨基酸。“-”代表缺失氨基酸。与抗原肽主链 N 端结合和 C 端结合的位点分别以“△”和“+”表示, 其余抗原肽结合位点以“○”表示。

Grgr-UA, Buca-UA, Cibo-UA and Nini-UA indicate the *MHC-I* sequences from *Grus grus*, *Bugeranus carunculatus*, *Ciconia boyciana*, and *Nipponia nippon*, respectively. Dot is indicated identical amino acids. Dash is indicated missing amino acids. Antigen mainchain binding sites for N terminal and C terminal of the antigen mainchain are indicated by triangle and cross, respectively. Other antigen binding sites are indicated by circle.

表 3 两种鹤 *MHC-I* 基因外显子 2 和 3 的非同义替换率和同义替换率

Table 3 Rates of non-synonymous and synonymous substitutions at exons 2 and 3 of *MHC-I* genes in two kinds of cranes

物种 Species	位置范围 Positions	密码子数 Codons	非同义替换率 Non-synonymous (d_N)	同义替换率 Synonymous (d_S)	d_N/d_S	<i>P</i>
灰鹤 <i>Grus grus</i>	抗原肽结合位点 ABS	37	0.126 4	0.017 2	7.348 8	0.008 8
	非抗原肽结合位点 Non-ABS	141	0.032 9	0.070 6	0.466 0	0.085 6
	整体 Total	178	0.050 7	0.057 8	0.877 2	0.369 9
肉垂鹤 <i>Bugeranus carunculatus</i>	抗原肽结合位点 ABS	37	0.130 0	0.060 6	2.145 2	0.075 4
	非抗原肽结合位点 Non-ABS	141	0.037 9	0.105 1	0.360 6	0.010 6
	整体 Total	178	0.055 3	0.094 5	0.585 2	0.058 6

ABS. 抗原肽结合位点。*P*. 自然选择显著性。ABS. Antigen binding sites. *P*. Significance of natural selection.

2.4 *MHC-I* 基因的系统发生

显子 3 以及两个外显子的合并序列构建贝叶斯

分别基于两种鹤 *MHC-I* 基因外显子 2、外 系统发生树 (图 2)。三颗系统发生树显示,

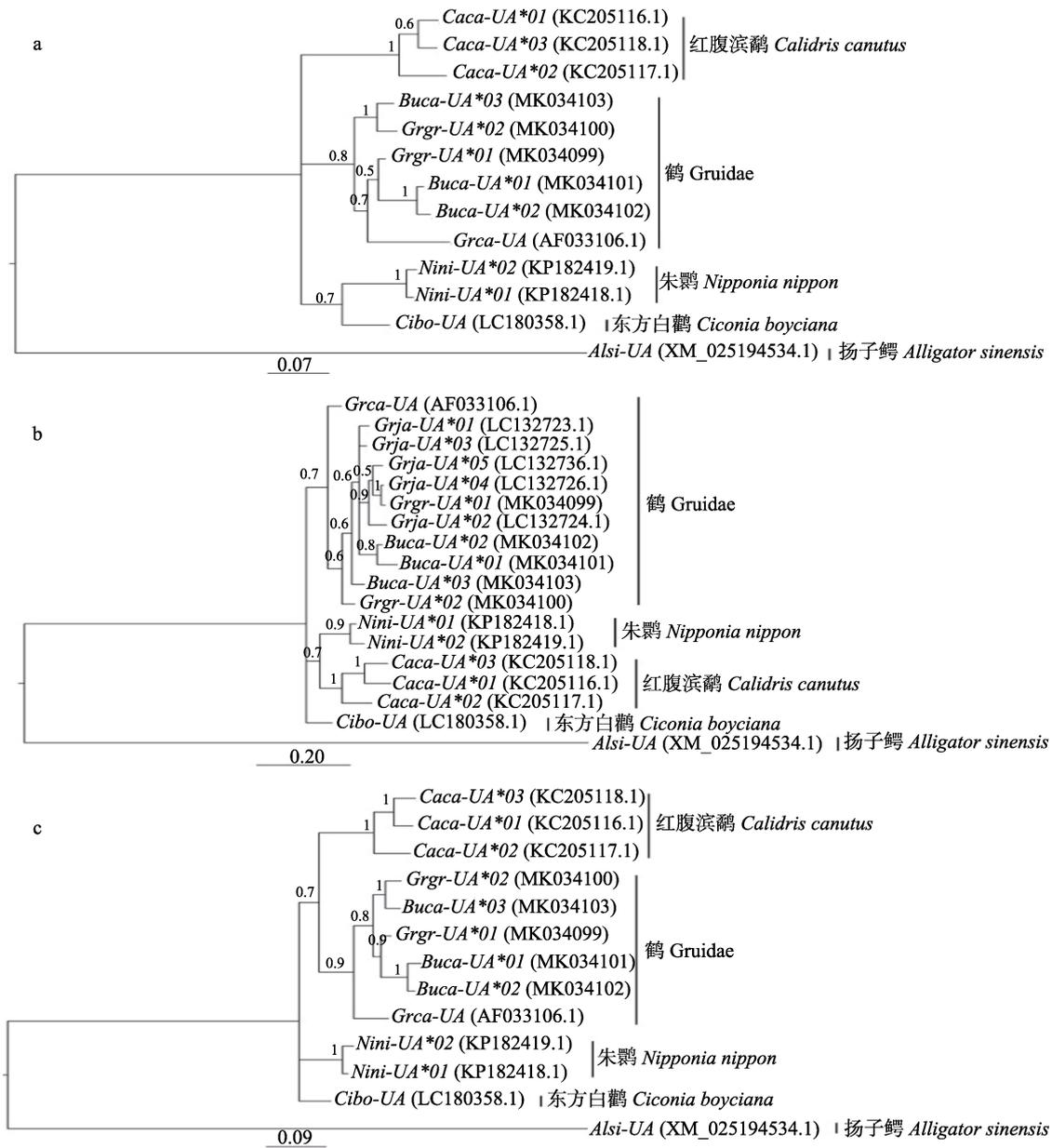


图 2 基于 *MHC-I* 基因外显子 2 (a)、外显子 3 (b) 及外显子 2 和 3 (c) 序列构建的贝叶斯系统发生树

Fig. 2 Phylogenetic trees constructed by Bayesian inference analysis based on exon 2 (a), exon 3 (b) and exons 2 and 3 (c) sequences of *MHC-I* genes

Grgr-UA、*Buca-UA*、*Grca-UA*、*Grja-UA*、*Cibo-UA*、*Nini-UA*、*Caca-UA* 和 *Alsi-UA* 分别代表灰鹤、肉垂鹤、沙丘鹤、丹顶鹤、东方白鹤、朱鹮、红腹滨鹬及扬子鳄的 *MHC-I* 基因序列。节点上的值表示后验概率。标尺表示每个核苷酸位点的取代率。

Grgr-UA, *Buca-UA*, *Grca-UA*, *Grja-UA*, *Cibo-UA*, *Nini-UA*, *Caca-UA* and *Alsi-UA* indicate the *MHC-I* sequences from *Grus grus*, *Bugeranus carunculatus*, *Grus Canadensis*, *Grus japonensis*, *Ciconia boyciana*, *Nipponia Nippon*, *Calidris canutus*, and *Alligator sinensis*, respectively. Value given at each node indicates posterior probability. Bar indicates the substitutions per nucleotide position.

鹤科动物的 *MHC-I* 基因以极高的自展值单独聚集成一大支, 而与朱鹮、东方白鹮以及红腹滨鹮等物种的基因序列分开, 表现出 *MHC-I* 基因的进化关系与物种分类地位的一致性 (图 2)。但在鹤科动物 *MHC-I* 基因进化支中, 肉垂鹤、灰鹤以及丹顶鹤的 *MHC-I* 序列未按物种形成单系群, 呈现出多系性的系统发育关系, 鹤科动物的 *MHC-I* 基因存在跨物种多态现象 (图 2)。

3 讨论

本研究利用一对通用引物扩增到灰鹤和肉垂鹤 *MHC-I* 基因片段 1 500 bp, 扩增片段覆盖该基因的外显子 2 至外显子 4 部分。通过克隆测序, 确定从灰鹤和肉垂鹤的基因组中分别分离到 2 条和 3 条 *MHC-I* 基因序列, 这暗示鹤科动物至少存在两个 *MHC-I* 基因座位。将 5 条序列的内含子部分裁剪后, 外显子序列均能够翻译成正常的氨基酸序列, 其间无插入、缺失和提前终止的发生, 表明分离到的序列应来自功能基因座位, 其在鹤科动物的免疫系统中具有生物学功能。研究表明, 不同鸟类间的 *MHC-I* 基因数量存在显著差异, 且经典和非经典基因的多态性及其所执行的生物学功能不同, 今后需进一步明确鹤科动物 *MHC-I* 基因的数量及性质 (蓝泓 2014, Zeng et al. 2016)。

两种鹤的 *MHC-I* 基因抗原肽结合位点经历着强烈的正选择作用, 而非抗原肽结合位点则经历负选择, 这种差异性选择在其他鸟类 *MHC-I* 基因研究中也发现。譬如, 在分离鸚雀 (*Chondestes grammacus*) *MHC-I* 基因的研究中发现, 其抗原肽结合位点的 $d_N/d_S = 1.127$, 非抗原肽结合位点的 $d_N/d_S = 0.483$ (Lyons et al. 2015)。在研究蓝冠山雀 (*Cyanistes caeruleus*) *MHC-I* 种群遗传变异时, 亦发现其抗原肽结合位点受到强烈的正选择, 而非抗原肽结合位点则经历负选择, 具体表现为抗原肽结合位点的 $d_N/d_S = 3.82$, 非抗原肽结合位点的 $d_N/d_S = 0.77$ (Wutzler et al. 2012)。抗原肽结合位点是脊

椎动物 MHC 分子结合病原多肽的关键部位, 在病原介导下受到强烈的正选择已被证实是维持 *MHC* 基因多态性的重要机制 (Bernatchez et al. 2003, Garrigan et al. 2003, Piertney et al. 2006)。此外, 鹤科动物抗原肽结合位点受到正选择作用也从一定层面印证了分离到的序列具有潜在生物学功能 (Tsaour et al. 1998, 杜合军等 2009)。

系统发生分析显示肉垂鹤、灰鹤、丹顶鹤的 *MHC-I* 基因序列并未按物种聚类, 而相互混杂在一起, 这提示跨物种多态性的存在。跨物种多态性是指不同物种间存在相同或相似的等位基因, *MHC* 基因跨物种多态现象普遍存在于近缘物种中 (李方等 2012, 刘志方等 2013, Kohyama et al. 2015, Kaesler et al. 2017)。目前, 有 3 种假说来解释 *MHC* 基因的跨物种多态现象。第一种是共同祖先假说, 近缘物种具有相同的祖先, 跨物种等位基因在物种未分化前就已存在于祖先基因组中, 并在近缘物种间遗传下来 (Klein 1987)。肉垂鹤、灰鹤和丹顶鹤隶属鹤亚科, 它们亲缘关系较近, 所以跨物种多态性可能是由共同祖先造成 (侯雨辰等 2015)。第二种机制是趋同进化假说, 不同动物为了应对相同的环境选择压力而产生相同的适应性 (Srithayakumar et al. 2012)。虽然鹤科动物均为涉禽, 主要栖息于湿地生境, 但它们的具体生存环境和分布范围存在一定差异。譬如, 肉垂鹤是非洲特有种, 主要分布在非洲东南部 (Jones et al. 2006), 而丹顶鹤主要分布于东亚及俄罗斯远东地区 (Akiyama et al. 2017)。因此, 相同或者相似病原介导的趋同进化可能不适用于解释鹤科动物 *MHC-I* 基因跨物种多态现象。第三种是渐渗杂交假说, 指两物种的杂交后代与亲本之一或双亲反复回交, 使得 *MHC-I* 等位基因在近缘种间融合并遗传 (Nadachowska-Brzyska et al. 2012)。虽然已有很多关于鹤科动物杂交产生可育后代的报道 (郑武忠等 2004), 但目前并未发现肉垂鹤与灰鹤或与丹顶鹤产生杂交后代。

因本研究所用的样本数有限, 导致用于比较的 *MHC-I* 序列数量较少。但比较结果显示, 两种鹤 *MHC-I* 基因外显子 2 和外显子 3 序列均呈现较高的多态性, *MHC-I* 基因的遗传变异信息可作为研究濒危鹤科动物种群遗传结构及其适应性进化的理想指标。目前, 已有保护生物学家利用 *MHC-I* 基因外显子 3 序列对丹顶鹤日本北海道种群的遗传变异展开研究, 结果从该种群分离到 16 条 *MHC-I* 基因序列, 种群遗传变异程度相对较低 (Akiyama et al. 2017)。但我们发现 *MHC-I* 基因外显子 2 和外显子 3 序列间的变异核苷酸和变异氨基酸的数量及所占比例基本相当, 因此上述研究有可能忽略掉了由外显子 2 变异产生的等位基因, 这提示濒危鹤科动物 *MHC-I* 基因外显子 2 和外显子 3 序列的遗传变异均需要加以关注。

参 考 文 献

- Akiyama T, Kohyama T I, Nishida C, et al. 2017. Genetic variation of major histocompatibility complex genes in the endangered red-crowned crane. *Immunogenetics*, 69(7): 451–462.
- Bennett G F, Khan R A, Campbell A G. 1974. *Leucocytozoon grusi* sp. n. (Sporozoa: Leucocytozoidae) from a sandhill crane, *Grus canadensis* (L.). *Journal of Parasitology*, 60(2): 359–363.
- Bernatchez L, Landry C. 2003. MHC studies in nonmodel vertebrates: what have we learned about natural selection in 15 years? *Journal of Evolutionary Biology*, 16(3): 363–377.
- Burland T G. 2000. DNASTAR's Lasergene sequence analysis software. *Methods in Molecular Biology*, 132: 71–91.
- Garrigan D, Hedrick P W. 2003. Perspective: detecting adaptive molecular polymorphism: lessons from the MHC. *Evolution*, 57(8): 1707–1722.
- Huelsenbeck J P, Ronquist F, Nielsen R, et al. 2001. Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. *Science*, 294(5550): 2310–2314.
- Jarvi S I, Goto R M, Gee G F, et al. 1999. Identification, inheritance, and linkage of B-G-like and MHC class I genes in cranes. *Journal of Heredity*, 90(1): 152–159.
- Jones K L, Rodwell L, McCann K I, et al. 2006. Genetic conservation of South African wattled cranes. *Biological Conservation*, 127(1): 98–106.
- Jones M R, Witt C C. 2014. Migrate small, sound big: functional constraints on body size promote tracheal elongation in cranes. *Journal of Evolutionary Biology*, 27(6): 1256–1264.
- Kaesler E, Kappeler P M, Brameier M. 2017. Shared evolutionary origin of major histocompatibility complex polymorphism in sympatric lemurs. *Molecular Ecology*, 26(20): 5629–5645.
- Klein J. 1987. Origin of major histocompatibility complex polymorphism: the trans-species hypothesis. *Human Immunology*, 19(3): 155–162.
- Kohyama T I, Akiyama T, Nishida C, et al. 2015. Isolation and characterization of major histocompatibility complex class II B genes in cranes. *Immunogenetics*, 67(11/12): 705–710.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K. 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7. 0 for bigger datasets. *Molecular Biology & Evolution*, 33(7): 1870–1874.
- Lillehoj H S, Ruff M D, Bacon L D, et al. 1989. Genetic control of immunity to *Eimeria tenella*. Interaction of MHC genes and non-MHC linked genes influences levels of disease susceptibility in chickens. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 20(2): 135–148.
- Lyons A C, Hoostal M J, Bouzat J L. 2015. Characterization of major histocompatibility complex class I loci of the lark sparrow (*Chondestes grammacus*) and insights into avian MHC evolution. *Genetica*, 143(4): 521–534.
- Matsubayashi M, Takami K, Abe N, et al. 2005. Molecular characterization of crane Coccidia, *Eimeria gruis* and *E. reichenowi*, found in feces of migratory cranes. *Parasitology Research*, 97(1): 80–83.
- Minias P, Bateson Z W, Whittingham L A, et al. 2016. Contrasting evolutionary histories of MHC class I and class II loci in grouse—effects of selection and gene conversion. *Heredity*, 116(5): 466–476.
- Nadachowska-Brzyska K, Zieliński P, Radwan J, et al. 2012. Interspecific hybridization increases MHC class II diversity in two sister species of newts. *Molecular Ecology*, 21(4): 887–906.
- Piertney S B, Oliver M K. 2006. The evolutionary ecology of the

- major histocompatibility complex. *Heredity*, 96(1): 7–21.
- Rivero-de Aguilar J, Westerdahl H, Martínez-de la Puente J, et al. 2016. MHC-I provides both quantitative resistance and susceptibility to blood parasites in blue tits in the wild. *Journal of Avian Biology*, 47(5): 669–677.
- Rozas J, Ferrer-Mata A, Sánchez-DelBarrio J C, et al. 2017. DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large datasets. *Molecular Biology & Evolution*, 34(12): 3299–3302.
- Sommer S. 2005. The importance of immune gene variability (MHC) in evolutionary ecology and conservation. *Frontiers in Zoology*, 2: 16.
- Srithayakumar V, Castillo S, Mainguy J, et al. 2012. Evidence for evolutionary convergence at MHC in two broadly distributed mesocarnivores. *Immunogenetics*, 64(4): 289–301.
- Tsaur S C, Ting C T, Wu C I. 1998. Positive selection driving the evolution of a gene of male reproduction, *Acp26Aa*, of *Drosophila*: II. Divergence versus polymorphism. *Molecular Biology & Evolution*, 15(8): 1040–1046.
- Wutzler R, Foerster K, Kempnaers B. 2012. MHC class I variation in a natural blue tit population (*Cyanistes caeruleus*). *Genetica*, 140(7–9): 349–364.
- Zeng Q Q, He K, Sun D D, et al. 2016. Balancing selection and recombination as evolutionary forces caused population genetic variations in golden pheasant MHC class I genes. *BMC Evolutionary Biology*, 16(1): 42.
- 杜合军, 郑劲松, 武敏, 等. 2009. 长江江豚 MHC-DRB 基因第二外显子的分离鉴定. *水生生物学报*, 33(5): 804–810.
- 侯雨辰, 丁楠, 夏灿玮. 2015. 鹤科鸟类鸣声特征的演化. *动物学杂志*, 50(1): 31–40.
- 蓝泓. 2014. 朱鹮 I、II 类 MHC 多位点单倍型及其适应性进化研究. 杭州: 浙江大学博士学位论文.
- 李方, 疏义林, 吴海龙. 2012. 凹耳蛙 MHC II 类 B 基因第二外显子多态性分析. *生物多样性*, 20(2): 184–192.
- 刘志方, 吴长新, 张辉, 等. 2013. 新疆哈萨克绵羊 MHC I 类基因第二、三外显子序列多态性分析. *石河子大学学报: 自然科学版*, 31(2): 170–175.
- 郑武忠, 陈金洪. 2004. 圈养丹顶鹤与白枕鹤杂交繁育. *四川动物*, 23(1): 37–40.