

# 两种竹鸡线粒体 DNA 的遗传变异

黄族豪<sup>①</sup> 张姣<sup>②</sup> 刘发<sup>②\*</sup> 肖宜安<sup>①</sup> 刘生<sup>①</sup> 龙进<sup>①</sup>

(<sup>①</sup> 井冈山大学生命科学学院 吉安 343009; <sup>②</sup> 兰州大学生命科学学院 兰州 730000)

**摘要:** 采用 PCR 和直接测序的方法测定灰胸竹鸡 (*Bambusicola thoracica*) 与棕胸竹鸡 (*B. fytchii*) 线粒体 DNA (mtDNA) 控制区 1 142 bp 的序列, 分析二者间的遗传变异。两种竹鸡间共发现 32 个变异位点, 其中 20 个转换, 12 个颠换。灰胸竹鸡 mtDNA 控制区的碱基含量 T 34. 26%、C 25. 98%、A 24. 84% 和 G 14. 96%, 棕胸竹鸡的分别是 T 34. 47%、C 25. 60%、A 25. 03% 和 G 14. 93%。*t*-检验分析显示, 两种竹鸡 mtDNA 控制区的 T 和 C 含量差异显著。在系统发生树上, 两种竹鸡在系统发生树各聚成一支, 支持率达到 100%。两种竹鸡间的遗传距离是 0. 039 6。根据分子钟计算, 它们大约在 200 万年前分歧进化。推测它们的物种形成主要受更新世第二次寒冷期的影响。

**关键词:** 线粒体 DNA 控制区; 灰胸竹鸡; 棕胸竹鸡; 遗传变异

中图分类号: Q951 文献标识码: A 文章编号: 0250 3263(2008)01- 21- 05

## Genetic Variation between *Bambusicola thoracica* and *B. fytchii* Based on Mitochondrial DNA

HUANG Zu-Hao<sup>①</sup> ZHANG Jiao<sup>②</sup> LIU Nai-Fa<sup>②\*</sup> XIAO Yi-An<sup>①</sup> LIU Mi-Sheng<sup>①</sup> LONG Jin<sup>①</sup>

(<sup>①</sup> School of Life Sciences, Jinggangshan University, Ji'an 343009;

<sup>②</sup> School of Life Sciences, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China)

**Abstract:** Polymerase chain reaction and direct sequencing methods were used to analyze the genetic variation between *Bambusicola thoracica* and *B. fytchii*. A total of 1 142 nucleotides of the mitochondrial DNA control region were sequenced. There are 32 variable positions, with 20 transitions and 10 transversions. The nucleotide composition of *B. thoracica* mtDNA D loop was: 34. 26% T, 25. 98% C, 24. 84% A and 14. 96% G. That of *B. fytchii* was: 34. 47% T, 25. 60% C, 25. 03% A and 14. 93% G. There were very significant differences in T and C nucleotide composition between the two bamboo partridges. The phylogenetic tree grouped two bamboo partridges into two deeply divergent clusters (supported by BP= 100%). Genetic distance was 0. 039 6 between the two partridges. Calibrated rates of molecular evolution suggested that they could have speciated 2. 00 million years ago, affected by the Pleistocene second frigid.

**Key words:** Mitochondrial DNA D loop; *Bambusicola thoracica*; *B. fytchii*; Genetic variation

灰胸竹鸡 (*Bambusicola thoracica*) 和棕胸竹鸡 (*B. fytchii*) 隶属鸡形目 (Galliforms) 雉科 (Phasianidae) 竹鸡属 (*Bambusicola*)。灰胸竹鸡是我国特有种, 主要分布于长江流域以南地区, 北达陕西南部, 西至四川盆地西缘, 东及台湾省; 棕胸竹鸡国内见于四川西南部、云南西部和南部, 国外见于越南北部、缅甸和印度等地<sup>[1]</sup>。

国内外有关竹鸡的研究很少, 仅在笼养灰胸竹

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 30530130, 30760036), 江西省教育厅科技项目 (赣教技字 2007 323);

\* 通讯作者, E-mail: nafaliu@sohu.com;

第一作者介绍 黄族豪, 男, 博士, 副教授, 研究方向: 动物生态学和保护生物学; E-mail: hzhow@163.com.

收稿日期: 2007-09-08, 修回日期: 2007-11-05

鸡的生活习性、生理生化、人工繁殖、生物学特性<sup>[2]</sup>，棕胸竹鸡觅食行为<sup>[3]</sup>和两种竹鸡的核型<sup>[4]</sup>等方面有报道，Fumihito 等<sup>[5]</sup>分析了灰胸竹鸡与其他鸡类的遗传关系。

动物线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 是共价闭合的环状双链 DNA，具有母系遗传特性，进化速率非常快，约是单拷贝核 DNA 的 5~10 倍。线粒体 DNA 控制区 (D-loop) 分三个区：(1) 高变 I 区 (1~ 316 bp)，位于控制区左边 (5' 端)；(2) 中间保守 II 区 (317~ 784 bp)，位于终止结合序列和重链复制起始区之间，在进化上高度保守，并且富含 G，而 A 含量较低；(3) 保守序列 III 区 (785~ bp)，位于控制区右翼 (3' 端)<sup>[6]</sup>。控制区是非编码基因区，在进化过程中受环境的选择压力小，表现出更大的变异，是研究种系发生非常有效的分子标记<sup>[7]</sup>，在雉科鸟类的分类中已有不少报道<sup>[6,8,9]</sup>。近年来，利用 mtDNA 控制区序列探讨分类问题已成为分类学中的一种常用方法，该方法通过比较不同类群的同源 DNA，重建分子系统树，探讨类群间的分类地位和系统进化关系<sup>[10,11]</sup>。本文以 mtDNA 控制区基因为遗传标记，分析灰胸竹鸡和棕胸竹鸡的遗传变异，并探讨它们的物种形成。

## 1 材料与方法

**1.1 实验材料** 实验用的灰胸竹鸡 (代码: BT) 采自江西省永新县，共 5 个样本；棕胸竹鸡 (代码: BF) 采自云南省丽江市，共 3 个样本。以肝为实验材料，用 100% 乙醇保存。许多研究表明，在系统进化中竹鸡与原鸡 (*Gallus gallus*) 的关系最近<sup>[8,9]</sup>，所以本文用原鸡 (代码: gallus) 做外群，序列来自 GenBank，共两个样本 (登录号分别是: AB007720 和 AB007723)。

**1.2 DNA 提取、PCR 反应及测序** DNA 提取采用乙醇沉淀法，参照 Randi 等的方法<sup>[9]</sup>。用特异引物 PHDL (5'-AGG ACT ACG GCT TGA AAA GG-3')、PH1H (5'-TTA TGT GCT TGA CCG AGG AAC CAG-3')、L400 (5'-ATT TAT TGA TCG TCC ACC TCA CG-3') 和 PHDH (5'-CAT CIT GGC ATC TTC AGT GCC-3')<sup>[6]</sup> 进行 mtDNA 控制区基

因扩增，L 和 H 分别代表轻链和重链，引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。用 PHDL 和 PH1H、L400 和 PHDH 分别进行 PCR 反应，扩增约 500~ 600 bp 的序列。反应体积为 35  $\mu$ l，反应液中含 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3)，50 mmol/L KCl，1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>，*Taq* 酶 1 U，4 种 dNTP 各 150  $\mu$ mol/L，2 端引物各 10 pmol/L，DNA 模板约 100 ng。反应在 PE2400 仪上进行。循环参数为 95 °C 预变性 4 min；95 °C 变性 40 s，55~ 58 °C 复性 40 s，72 °C 延伸 60 s，共 32 个循环；最后 72 °C 10 min 延伸补齐。提取和扩增都设空白对照，并用 1% 的琼脂糖电泳检测。扩增产物用 Wizard<sup>TM</sup> PCR Preps DNA 纯化试剂盒 (Promega 公司) 纯化，然后在 ABI 377 基因分析仪上进行双向测序。测序由上海生工生物工程技术服务有限公司完成。

**1.3 序列分析** 用 Clustal X 程序<sup>[12]</sup> 对 DNA 序列进行对位排列，并经人工仔细核查。用 DnaSP 4.0 软件<sup>[13]</sup> 确定变异位点。用 MEGA 4.0<sup>[14]</sup> 统计碱基组成，用 Kimura 双参数模型<sup>[15]</sup> 计算遗传距离。用 Modeltest 3.0<sup>[16]</sup> 软件选择最佳建树模型，用 PAUP 4.0 构建最大相似性树<sup>[17]</sup>，并用自举检验<sup>[18]</sup> 估计系统树中结点的置信值。用 *t*-检验分析差异是否显著。

## 2 结果

**2.1 序列变异** 用 Clustal W 软件进行对位排列和剪切对齐后，共得到两种竹鸡线粒体 DNA 控制区 1 142 bp 的序列 (GenBank 登录号是 EU240207~ EU240214)。在所测的 5 个灰胸竹鸡和 3 个棕胸竹鸡序列中，两者之间共发现 32 个变异位点 (不包括种内变异位点)，占序列长度的 2.80%，其中 20 个转换、12 个颠换，无缺失位点。转换与颠换之比是 1.67: 1。20 个转换中，T-C 间的转换 (13 次) 比 A-G 间转换 (7 次) 多；12 个颠换中，A-T 间 5 次，G-T 间 4 次，A-C 间 3 次，无 G-C 间的颠换。

两种竹鸡之间，线粒体 DNA 控制区 I 区 (1~ 316 bp) 有 23 个变异位点，序列变异率为 7.28%，占总变异数的 71.88%；II 区 (317~ 784

bp) 有 6 个变异位点, 序列变异率为 0.64%, III 区(785~ bp) 仅 3 个变异位点, 序列变异率为 3.22%。

## 2.2 碱基含量 所测定的两种竹鸡线粒体控

表 1 两种竹鸡线粒体控制区序列的碱基含量

Table 1 Nucleotide composition of mtDNA D loop sequence between *Bambusicola thoracica* and *B.fytchii*

物种 Species	碱基含量 Nucleotide composition			
	T	C	A	G
灰胸竹鸡 <i>B. thoracica</i>	34.26 ± 0.018	25.98 ± 0.017	24.84 ± 0.023	14.96 ± 0.003
棕胸竹鸡 <i>B.fytchii</i>	34.47 ± 0.083	25.60 ± 0.030	25.03 ± 0.003	14.93 ± 0.003
<i>t</i> 检验 <i>t</i> -test	<i>t</i> = 2.17, <i>P</i> = 0.047	<i>t</i> = 4.88, <i>P</i> = 0.004	<i>t</i> = 1.43, <i>P</i> = 0.113	<i>t</i> = 0.00, <i>P</i> = 0.500

2.3 遗传距离和系统树 根据 Kumar 的双参数法计算两种竹鸡的遗传距离为 0.039 6。两种竹鸡与原鸡的遗传距离为 0.111 3。

基于所测的序列, 以原鸡为外群, 构建两种竹鸡的系统发生树。用 Modeltest 3.0 分析最佳

制区序列的碱基含量见表 1, T 含量最高, G 含量最低。两种竹鸡间 T 和 C 含量差异显著, 而 A 和 G 含量差异不明显。

模型是 GTR+ I (-lnL = 2 493.99), 构建的最大相似性树见图 1。灰胸竹鸡和棕胸竹鸡在系统树上各聚成一支。各分支的置信度都很高, 其中种间的置信度达到 100% (图 1)。

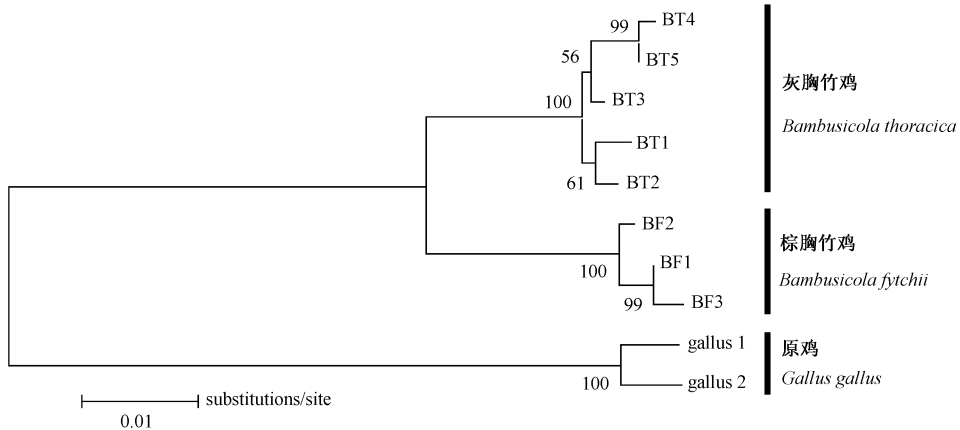


图 1 根据两种竹鸡线粒体 DNA 控制区序列基于 GTR+ I 模型构建最大相似性树

Fig. 1 Maximum likelihood tree of *Bambusicola thoracica* and *B.fytchii* constructed from mtDNA D loop sequence based on GTR+ I model

BT 代表灰胸竹鸡, BF 代表棕胸竹鸡, gallus 代表原鸡。

BT, BF and gallus represent *Bambusicola thoracica*, *B.fytchii* and *Gallus gallus* respectively.

## 3 讨论

灰胸竹鸡和棕胸竹鸡线粒体 DNA 控制区的碱基含量与其他鸟类线粒体 DNA 控制区的含量相近<sup>[6,7]</sup>。两种竹鸡 mtDNA 控制区间 T 和 C 含量差异显著, 说明 T 和 C 的变异比较大,

T-C 的转换(13 次)比 A-G 转换(7 次)多。两种竹鸡 mtDNA 控制区的 A+T 含量比 G+C 含量高, 这与 mtDNA 控制区是 A 和 T 丰富区一致。两种竹鸡的核型完全一样<sup>[4]</sup>, 但二者间的遗传距离高达 0.039 6, 比石鸡(*Alectoris chukar*) 与大石鸡(*A. magna*) 间<sup>[19]</sup> 以及红腹锦鸡(*Chrysolophus*

*pictus*) 与白腹锦鸡 (*C. amherstiae*) 间<sup>[20]</sup> 的遗传距离大, 也远大于 4 种马鸡 (*Crossoptilon* spp.) 间<sup>[21]</sup> 的遗传距离。

两种竹鸡在系统发生树各聚成一支, 支持率 100% (图 1)。根据鸟类 mtDNA 的进化速率 2%/百万年<sup>[22]</sup> 计算, 两种竹鸡大约在 1.98 百万年前分歧进化。鸟类线粒体 DNA 的分子钟一直存在较大争议。由于动物线粒体 DNA 控制区各区变异速率不同, 很难给定一个准确而恒定的分子进化速率<sup>[23]</sup>。由于转换很容易饱和, 因此常用颠换来估算种间或种群间的分歧时间<sup>[9]</sup>。因为没有竹鸡起源进化时间可以参考, 我们参考石鸡与大石鸡 mtDNA 控制区的碱基颠换速率来计算两种竹鸡的分歧时间。两种石鸡的分歧时间是 1.90 百万年前<sup>[6]</sup>, 二者间 mtDNA 控制区全序列的碱基颠换数是 10 个, 即两种石鸡间的碱基颠换速率是 5.26/百万年<sup>[24]</sup>。两种竹鸡间的碱基替换数是 12 个, 其分歧时间大约是 2.28 百万年前。可见两种竹鸡大约在 2.00 百万年前分歧进化, 属于早更新世, 比化石记录的年代<sup>[25]</sup> 早。

两种竹鸡分歧进化的年代与更新世第二次寒冷期 (1.28~ 2.05 百万年)<sup>[25]</sup> 发生的时间吻合。我国一些雉科鸟类近缘种 (如红腹锦鸡和白腹锦鸡<sup>[20]</sup>、石鸡和大石鸡<sup>[6, 19]</sup>、藏马鸡 *C. harmani* 和褐马鸡 *C. auritum*<sup>[21]</sup> 等) 的分歧时间也与这次寒冷期的时间一致。更新世时期气候剧烈变动, 欧亚大陆冰期、间冰期交替发生, 几乎每十万年就有一次较大的冰期。更新世地理环境和气候的演变对物种的形成、演化产生重大影响<sup>[27, 28]</sup>。更新世第二次寒冷期持续的时间达 77 万年, 是更新世几次寒冷期持续时间最长的, 对两种竹鸡的物种形成可能起决定性作用。依地理分布和生态地理环境, 两种竹鸡可能起源于我国西南山地。西南山地地形复杂, 气候多样, 在第四纪没有受大面积冰盖等因素影响, 普遍认为该地区是许多动物的分布中心、起源地和冰期避难所, 特别是许多雉科鸟类的起源地。更新世早期, 两种竹鸡的祖先种群可能广泛分布于我国西南山地到华中华南地区。由于

第二次寒冷期的影响, 强大的山脊冰川将其分别隔离在不同低地, 隔离进化, 最终形成灰胸竹鸡和棕胸竹鸡。

## 参 考 文 献

- [1] 郑作新. 中国动物志 鸟纲 第四卷 鸡形目. 北京: 科学出版社, 1978.
- [2] 王定江, 杨汉远, 余志彪等. 灰胸竹鸡的生物学特性及经济价值. *四川动物*, 2007, **26**(3): 592~ 594.
- [3] 杨晓君, 周建平, 杨岚. 棕胸竹鸡觅食行为的观察. *动物学研究*, 1991, **12**(3): 259~ 264.
- [4] 卞小庄, 蔡含钧, 李庆伟等. 鸟类核型研究 XII. 雉科 10 种鸟类. *动物学研究*, 1992, **14**(3): 258~ 262.
- [5] Fumihito A, Miyaket T, Takadat M, *et al.* The genetic link between the Chinese bamboo partridge (*Bambusicola thoracica*) and the chicken and junglefowls of the genus *Gallus*. *PNAS*, 1995, **92**: 11 053~ 11 056.
- [6] Randi E, Lucchini V. Organization and evolution of the mitochondrial DNA control region in the avian genus *Alectoris*. *J Mol Evol*, 1998, **47**(4): 449~ 462.
- [7] Baker A J, Marshall H D. Mitochondrial control region sequences as tools for understanding the evolution of avian taxa. In: Mindell D P ed. *Avian Molecular Systematics and Evolution*. New York: Academic Press, 1997, 49~ 80.
- [8] 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 and Evol*, 1999, **11**(1): 38~ 54.
- [9] Kimball R T, Braun E L, Ligon J D, *et al.* A molecular phylogeny of the peacock pheasants (Galliformes: *Polyplectron* spp.) indicates loss and reduction of ornamental traits and display behaviours. *Biol J Linn Soc*, 2001, **73**: 187~ 198.
- [10] Avise J C. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. New York: Chapman & Hall, 1994.
- [11] 李庆伟, 马飞. *鸟类分子进化与分子系统学*. 北京: 科学出版社, 2007.
- [12] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F. The Clustal X windows interface flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tool. *Nucleic Acid Research*, 1997, **24**: 4 876~ 4 882.
- [13] Rozas J, Rozas R. DnaSP Version 4 and integrated program for molecular population genetics and molecular evolution analysis. *Bioinformatics*, 1999, **15**: 174~ 175.
- [14] Tamura K, Dudley J, Nei M, *et al.* MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol*, 2007, **24**: 1 596~ 1 599.

- [15] Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions though comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol*, 1980, **16**: 111~ 120.
- [16] Posada D, Crandall K A. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 1998, **14**: 817~ 818.
- [17] Strimmer K, von Haeseler A. Quartet puzzling: a quartet maximum likelihood method for reconstructing tree topologies. *Mol Biol Evol*, 1996, **13**: 964~ 969.
- [18] Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, 1985, **39**: 783~ 791.
- [19] 黄族豪, 刘发, 龙进等. 从线粒体 DNA 控制区基因比较石鸡和大石鸡的遗传变异. 江西农业大学学报, 2006, **28**(3): 420~ 424.
- [20] 黄族豪, 龙进, 张立勋等. 从线粒体 DNA 控制区探讨红腹锦鸡和白腹锦鸡的分类关系. 江西师范大学学报, 2006, **30**(1): 91~ 94.
- [21] 吴爱平, 丁炜, 张正旺等. 马鸡属鸟类的系统发育关系. 动物学报, 2005, **51**(5): 898~ 902.
- [22] Shields G F, Wilson A C. Calibration of mitochondrial DNA evolution in geese. *J Mol Evol*, 1987, **24**: 212~ 217.
- [23] Loewe L, Scherer S. Mitochondrial eve: the plot thickens. *Trends Ecol Evol*, 1997, **12**: 422~ 423.
- [24] Huang Z H, Liu N F, Luo S X, et al. Phylogeography of rusty-necked partridge (*Alectoris magna*) in northwestern China. *Mol Phylogenet Evol*, 2007, **43**: 379~ 385.
- [25] 侯连海. 周口店更新世鸟类. 见: 张森水编. 古脊椎动物与古人类研究所集刊. 北京: 科学出版社, 1993.
- [26] 曹兴山. 甘肃第四纪气候期划分. 干旱区研究, 1996, **13**(3): 28~ 40.
- [27] Avise J C. The history and preview of phylogeography: a personal reflection. *Mol Evol*, 1998, **7**: 371~ 379.
- [28] Hewitt G M. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*, 2000, **405**: 907~ 913.

## “动物行为学高级培训班暨首次动物行为学研讨会”在京举行

“动物行为学高级培训班暨首次动物行为学研讨会”于 2007 年 12 月 11~ 14 日在中国科学院动物研究所成功举办, 参会人员约 150 人。来自国内、外不同领域从事动物行为学研究的知名学者就精子竞争和近交回避(康乐)、行为的遗传和基因调节(孙中生)、行为的神经机制(罗敏敏、徐富强)、紫外光在蜘蛛通讯的作用(李代芹)、动物的声通讯和发声机制(沈钧贤、王丁、左明雪)、性比和共存(张大勇)、灵长类的社会行为(李进华)、痛觉心理(罗非)、鼠类的取食行为(张知彬和肖治术)、人与海豚的行为关系(Sara Platto)、动物行为与动物园设计(Carin Harrington)等应邀做了大会报告, 使大家充分了解了动物行为学研究的前沿和热点。会议日程除了大会报告外, 还穿插一些培训讲座。美国 Central Washington University 大学的孙立新做了动物行为学系列讲座; 新加坡国立大学李代芹结合自己的研究讲解了如何在动物行为学研究中变换角度寻找新的研究思路; 中国科学院动物研究所蒋志刚、心理研究所王玮文和王冬梅分别讲授了动物行为学研究方法和动物行为心理实验方法; 陕西师范大学邵发道和北京师范大学刘定震讲授了行为的生理和神经机制。

这次会议是中国科学院动物生态学海外合作伙伴项目和中国动物学会整合动物学系列学术活动之一。由中国科学院动物研究所主办, 中国科学院心理研究所、安徽大学、北京师范大学协办, 得到中国科学院动物生态学海外合作伙伴项目、中国科学院人事教育局以及安徽大学的资助。农业虫害鼠害综合治理研究国家重点实验室张健旭和王睿等做了大量的会议组织工作。

大会决定组织动物行为学各研究领域的专家编写出版《动物行为学专论》、出版内部电子刊物《动物行为学研究通讯》、准备成立隶属于中国动物学会的“动物行为学专业委员会”, 并筹办“动物行为学研究华人促进会”。

通过磋商, 第二次会议计划于 2009 年在黄山举行, 由安徽大学承办。

张健旭<sup>①</sup> 蒋志刚<sup>①</sup> 李进华<sup>②</sup>

(<sup>①</sup>中国科学院动物研究所 北京 100101; <sup>②</sup>安徽大学 合肥 230039)