

基于线粒体控制区的滇金丝猴群体遗传学研究

潘 登^{1~3}, 符云新^{4,2}, 张亚平^{1,2}

(1. 中国科学院昆明动物研究所 细胞与分子进化重点实验室, 昆明 650223;
2. 云南大学生物资源保护和利用重点实验室, 昆明 650091; 3. 中国科学院研究生
分院, 北京 100049; 4. 德克萨斯大学休斯顿分校, 美国 德克萨斯 77030)

摘要:滇金丝猴 (*Rhinopithecus bieti*) 是我国著名的濒危保护动物。迄今为止, 关于滇金丝猴并基于 DNA 序列的群体遗传学研究还没有报道。文章测定了来自于云南省维西县滇金丝猴群体样本的线粒体控制区全序列以及部分个体的细胞色素 b 全序列。在排除了核线粒体假基因存在的可能性之后, 滇金丝猴维西群体内部被确认存在着两个序列分歧较大的分枝。即使如此, 如果考虑到群体结构和迁移的影响, 维西群体的遗传多样性水平可能并不高。

关键词:滇金丝猴; 线粒体控制区; 遗传多样性; 群体结构

中图分类号: Q953

文献标识码: A

文章编号: 0253 - 9772(2006)04 - 0432 - 05

Population Genetics of *Rhinopithecus bieti*: a Study of the Mitochondrial Control Region

PAN Deng^{1~3}, FU Yur-Xin^{4,2}, ZHANG Ya-Ping^{1,2}

(1. Laboratory of Cellular and Molecular Evolution and Molecular Biology of Domestic Animals, Kunming Institute of Zoology, Kunming 650223, China; 2. Laboratory for Conservation and Utilization of Bio-resources, Yunnan University, Kunming 650091, China; 3. The Graduate School, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 4. Human Genetics Center, University of Texas at Houston, Houston, Texas 77030, USA)

Abstract: Yunnan snub-nose monkey (*Rhinopithecus bieti*) is a famous endangered primate in China. So far, however, studies on its population genetics based on DNA sequences are not available. In this paper, the whole mitochondria control region of the samples from Weixi, Yunnan Province as well as the whole cytochrome b gene in some individuals were sequenced. A deep divergence was observed within the Weixi population, which was confirmed after excluding the possibility of existence a nuclear pseudogene. Nonetheless, if the effects of population structure and migration are considered, the true level of polymorphism of the Weixi population may be not as high as observed.

Key words: Yunnan snub-nose monkey; mitochondria control region; genetic polymorphism; population structure

滇金丝猴 (*Rhinopithecus bieti*) 隶属于疣猴亚科 (Colobinae) 金丝猴属 (*Rhinopithecus*)^[1], 是我国特有的濒危一级保护动物, 现分布于我国云南省德钦、兰坪、维西、丽江和西藏自治区的芒康等 5 县境内^[2]。滇金丝猴终年生活在冰川雪线附近的高山针

叶林带中, 平均海拔 3 200 ~ 4 200 m, 栖息环境十分恶劣^[2,3], 是灵长类动物中唯一能够生活在高海拔且气候寒冷的物种^[4], 因此, 具有很高的研究价值。但是, 滇金丝猴目前处于十分濒危的状态, 已被 IUCN (www.redlist.org) 定为极危 (CR) 级。野外

收稿日期: 2005 - 04 - 12; 修回日期: 2006 - 02 - 12

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 (编号: 2003CB415105)、国家自然科学基金和云南省科技厅的资助 [Supported by the National Basic Research Program (No. 2003CB415105), NSFC and the Science and Technology Department of Yunnan Province]

作者简介: 潘 登 (1978 -), 男, 湖北武汉人, 博士, 研究方向: 保护遗传学。E-mail: pdaeng@gmail.com

通讯作者: 张亚平 (1965 -), 男, 云南昭通人, 研究员, 中国科学院院士, 博士生导师, 研究方向: 分子进化。E-mail: zhangyp1@263.net.cn

调查显示,现存滇金丝猴一共只有 13 个自然群体,其种群数量总共约 1 000 ~ 1 500 只,并且更为严重的是,各个自然种群体成岛屿状分布并相互隔离^[2]。因此,也有估计认为野外滇金丝猴群体在 10 年后灭绝的几率可达 50 %^[4]。

濒危动物的群体遗传学信息对于科学的制定保护遗传学策略有着重要的意义。遗憾的是,由于样品采集困难,迄今为止,相关的信息还非常有限。Su 和 Shi^[5]通过蛋白质电泳发现滇金丝猴群体的遗传多样性水平很低。王文等^[6]通过 RAPD 也发现滇金丝猴群体的遗传多样性极其贫乏。相对于蛋白质电泳和 RAPD 数据而言,DNA 序列的解析度更高,Zhang 和 Oliver^[7]测定了滇金丝猴细胞色素 b(Cyt b)基因的部分序列,却发现存在着一定的分歧。由于哺乳动物线粒体基因的进化速率是单拷贝核基因的 5 ~ 10 倍,适合于群体遗传学分析^[8]。为了进一步提供更多的群体遗传信息,我们测定了 10 个来自于维西的滇金丝猴样品的线粒体控制区(D-loop)全序列及部分个体的细胞色素 b(Cyt b)基因全序,以期作更加深入的研究。

1 材料和方法

1.1 样本来源,总 DNA 提取,PCR 以及 DNA 序列测定

所有的样品都来自于云南省维西县(图 1),并且均为血液样本,个体的编号依次从 D1 至 D10。总 DNA 提取采用的是标准的酚-氯仿抽提法^[9]。PCR 以及测序引物参见表 1。



图 1 滇金丝猴样品分布

修改自文献[5]。阴影部分为样品采集地。

Fig. 1 Distribution of *Rhinopithecus bieti* samples
Modified from reference [5]. The shaded area represents
the site of sample collection.

表 1 PCR 以及测序反应引物表

Table 1 Sequences of primers used for
PCR and sequencing

引物名称 Primers	引物序列 Primer Sequences	目的基因 Target Gene
L1	5'-AGC ACC TAA CTC CAC CGC CA-3	D-loop
L2	5'-ACC GAG CAT CCA TAA ACA ATC C-3	D-loop
L3	5'-CCA TGC TTG TTA GAC ATA CA-3	D-loop
H1	5'-GGG TCC GTC TAG ACA TTT TC-3	D-loop
H2	5'-GGG GTT TGA GTA AGGATA GC-3	D-loop
H3	5'-GAG GGT AAC ACT GCT TGT GC-3	D-loop
L14724	参见文献[10]	Cyt b
LC2	5'-GAG GAC AAA TAT CAT TCT G-3	Cyt b
LC3	5'-TTA AGT GAC CCA GAC AAC-3	Cyt b
H15915	参见文献[10]	Cyt b
HC2	5'-GTT GTC TGG GTC ACT TAA AAG GTC-3	Cyt b
HC3	5'-CCT CAG AAT GAT ATT TGT CC-3	Cyt b

除了引物序列不同以外,扩增线粒体控制区和细胞色素 b 的反应体系和条件完全相同,即:预变性 95 °C 2 min;40 个循环反应,其中每个循环反应包括:94 °C 变性 1 min,55 °C 退火 1 min 以及 72 °C 延伸 1 分 10 s;72 °C 后延伸 10 min。每 50 μL 反应体积的组成包括:基因组总 DNA 50 ng,5 μL dNTP (4 mmol/L/μL),引物各 1 μL (10 mmol/L/μL),Taq DNA 聚合酶 2U (TaKaRa Inc)。L1 和 H1 用于扩增整个 D-loop 基因,而 L14724 和 H15915 用于扩增整个 Cyt b 基因,其余的引物为测序内引物。PCR 产物使用试剂盒(上海生工生物工程技术有限公司)回收。最后在 ABI 377 (ABI Inc)全自动测序仪上对回收产物进行测序。所有片段均测定了正反链以确保匹配。同时,我们还进一步测定了部分个体的 Cyt b 基因的序列,以印证 D-loop 序列的可靠性(见结果和讨论部分)。

1.2 数据分析

序列经校对后,使用 MegaAlign 程序 (DNASTAR Inc) 进行排序。核酸差异数和核酸多态度 (nucleotide diversity, π) 由 DNAsp version 4 程序^[11] 统计得到。基因树用 PAUP * 4.0b 构建^[12], 构树的方法包括最大似然法 (maximum likelihood, ML) 和邻接法 (Neighbor-joining, NJ)^[13]。在构建 ML 之前,我们使用 ModelTest 3.0^[14] 对碱基替换模型进行选

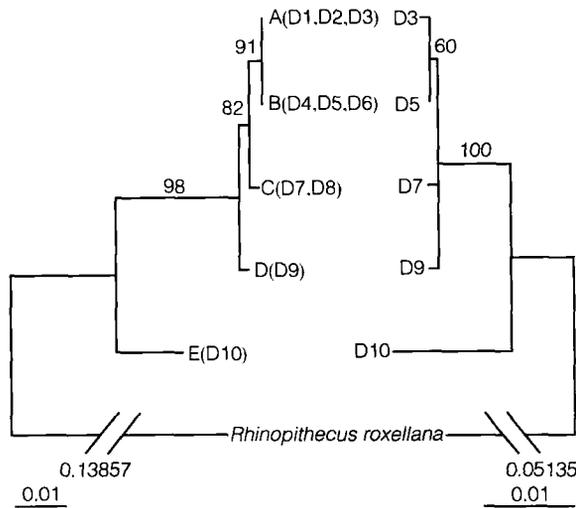


图 2 滇金丝猴群体线粒体控制区以及细胞色素 b 基因树
左边的部分是线粒体控制区的基因树,右边的部分是细胞色素 b 的基因树。括号中是线粒体控制区单倍型所包含的个体代号。枝上的数字表示的是 Bootstrap 值。

Fig.2 Phylogenetic trees of the mitochondrial control region and cytochrome b gene in *Rhinopithecus bieti*

The phylogenetic tree on the left is the one for the mitochondrial control region, the one to the right is that for the cytochrome b gene. Labels within the parentheses are codes assigned to the individuals having a particular mitochondrial control region haplotype. Numbers on the branches represent the Bootstrap values.

(表 3) 不适合于用简约法构树。ML 构树时的 ModelTest 选择的也是 HKY 突变模型^[18]。同样由于 Cyt b 的 ML 树和 NJ 树的拓扑结构类似,所以我们只绘出 ML 树(图 2 右边部分)。由图 2 可知,D-loop 和 Cyt b 的基因树的拓扑结构是一致的,表明 D10 不是来自核基因组上的假基因,这是因为 D10 的 D-loop 和 Cyt b 序列同时是假基因的可能性很小。因此,检测到的多态应该均来自于线粒体,那么滇金丝猴维西群体内部便确实存在着一个很大的分歧,这和 Zhang 和 Oliver^[7]的观察吻合。一种合理的解释是,D10 所表示的世系或许是邻近群体迁移来的类型,并由于近期栖息地片断化而滞留在了维西群体之内。至于其他的个体,它们之间的序列差异则比较小,多样性程度很低,这和 Su 和 Shi^[5]以及王文等^[6]的结论相同,表明在各自的世系中多样性水平实际上不高。但是,由于样本量不大,我们不能确定是否还有中间类型的存在,同时,由于缺少周边群体样品的数据,我们并不能确定 D10 个体的来源。因

此,居于以上分析,我们的推测还有待进一步研究证实。

综上所述,对滇金丝猴线粒体控制区以及细胞色素 b 的研究显示:维西滇金丝猴群体的内部存在

表 3 细胞色素 b 多态位点分布表

Table 3 Distribution of polymorphism sites in the cytochrome b gene

个体	多态位点	GenBank 编号
Individuals	Polymorphic sites	GenBank No.
	*	
	11111	
	1222233344555566777778899900011	
	36412278066351345746134461701255900	
	06533532378833438353271486095437014	
D3	TCTAICTAGGTTACTTTCCTCATTCCTCCGGICCGGAA	AY998831
D5C.....	AY998832
D7C..T.....T.....	AY998833
D9C.....T.....T.....	AY998834
D10	CTCGCTCGAACCCTCC.ATCCCTTAAATTAA.G	AY998835

*:简约位点。

*:Refers to parsimonious sties.

两个序列分歧较大的分歧,从而造成总体的遗传多样性较高。但这也许只是一个表面现象,因为在考虑群体的结构和迁移的情况下,群体实际遗传多样性水平可能并不高。我们的工作提示:如果忽略群体内部存在的结构和隔离,观察到的遗传多样性水平会被高估,并有可能得出错误的结论。由于隔离在濒危动物的群体中是普遍存在的,所以在研究濒危动物遗传多样性水平的时候要尤其注意这个问题。

参考文献(References):

[1] Groves C P. Primate Taxonomy. Wanshington: Smithsonian Institute Press, 2001.
 [2] LONG Yong-Cheng, ZHONG Tai, XIAO Li. Study on geographical distribution and population of the Yunnan Snub nosed monkey. Zoological Research, 1996, 17(4): 437 ~ 441.
 龙勇诚,钟泰,肖李.滇金丝猴地理分布、种群数量与相关生态学的研究. 动物学研究,1996, 17(4): 437 ~ 441.
 [3] Zhao Q K, He S J. Excrement distribution and habitat use in *Rhinopithecus bieti* in winter. Am J Primatol, 1988, 3: 275 ~ 284.
 [4] QUAN Guo - Qiang, XIE Jia - Hua. Study of Golden Monkey. Shanghai: Shanghai Science Technology and Education Publish-

- ing House, 2002.
- 全国强, 谢家骅. 金丝猴研究. 上海: 上海科学技术教育出版社, 2002.
- [5] Su B, Shi L M. Genetic diversity in the snub-nosed monkey (*Rhinopithecus bieti*) as estimated by protein electrophoresis. *Conservation Biology*, 1995, 9: 847 ~ 951.
- [6] WANG Wen, SU Bing, ZHANG Ya-Ping, LIN Shi-Ying, LIU Rui-Qing, LIU Ai-Hua, HU Hong-Guang, XIE Yur-Xin, WU Deng-Hu. rDNA Difference and Phylogenetic Relationship of Two Species of Golden Monkeys Three Species of Leaf Monkeys. In: XIA Wuping, ZHANG Rong-Zu, eds. *Primate Research and Conservation*. Beijing: China Forest Publishing House, 1995, 77 ~ 81.
- 王文, 宿兵, 张亚平, 林世英, 刘瑞清, 刘爱华, 胡宏光, 谢育新, 吴登虎. 川、滇金丝猴和三种叶猴的核糖体 DNA 变异及系统进化关系. 见: 夏武平, 张荣祖主编. *灵长类研究与保护*. 北京: 中国林业出版社, 1995, 77 ~ 81.
- [7] Zhang Y P, Oliver A R. Mitochondrial cytochrome b gene sequences of old world monkeys: with special reference on evolution of Asian Colobines. *Primates*, 1998, 39(1): 39 ~ 49.
- [8] Avise J C. Ten unorthodox perspectives on evolution prompted by comparative population genetic findings on mitochondrial DNA. *Annu Rev Genet*, 1991, 25: 45 ~ 69.
- [9] Sambrook J, Russell D. *Molecular Cloning*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [10] Irwin D M, Kocher T D, Wilson A C. Evolution of the cytochrome b gene of mammals. *J Mol Evol*, 1991, 32(2): 128 ~ 144.
- [11] Rozas J, Sanchez-DelBarrio X M, Rozas R. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*, 2003, 19: 2496 ~ 2497.
- [12] Swofford D L. Paup *, *Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and Other Methods)*. Version 4. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, 1998.
- [13] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*, 1987, 4(4): 406 ~ 425.
- [14] Posada D, Crandall K A. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 1998, 14(9): 817 ~ 818.
- [15] Nei M. *Molecular evolutionary genetics*. New York: Columbia University Press, 1987.
- [16] Watterson GA. On the number of segregating sites in genetical models without recombination. *Theor Popul Biol*, 1975, 7(2): 256 ~ 276.
- [17] Tajima F. Evolutionary relationship of dna sequences in finite populations. *Genetics*, 1983, 105(2): 437 ~ 460.
- [18] Hasegawa M, Kishino H, Yano T. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J Mol Evol*, 1985, 22(2): 160 ~ 174.
- [19] Woischnik M, Moraes C T. Pattern of organization of human mitochondrial pseudogenes in the nuclear genome. *Genome Res*, 2002, 12(6): 885 ~ 893.
- [20] Tourmen Y, Baris O, Dessen P, Jacques C, Malthiery Y, Reynier P. Structure and chromosomal distribution of human mitochondrial pseudogenes. *Genomics*, 2002, 80(1): 71 ~ 77.

兼职英文编辑招聘启事

《遗传学报》、《遗传》杂志是中国遗传学会和中国科学院遗传与发育生物学研究所主办的学术刊物, 已被美国化学文摘(CA)、生物学文摘(BA)、医学索引(IM/MEDLINE)、俄罗斯文摘杂志(AJ)和《中国学术期刊文摘》、《生物学文摘》等 20 余种国内外重要检索系统与数据库收录。主要刊载遗传学、发育生物学、基因组学等领域有创新性的原始研究论文以及遗传学热点问题的综述, 读者对象为基础医学、农林牧渔、生命科学领域的科研、教学人员和研究生。

为了加快期刊的国际化步伐, 扩大国际交流, 从 2006 年起, 《遗传学报》改为英文版, 由国际著名的 Elsevier 出版社与科学出版社联合出版。Elsevier 出版社负责在全球范围内通过所有电子媒介推广、出版和发行《遗传学报》的网上版本以及在中华人民共和国以外地区《遗传学报》纸质版的国际发行。2006 年起, 《遗传》杂志改为月刊, 充实英文摘要和文献、图表的英文对照。详情请登录“中国遗传网”www.Chinagene.cn。

根据工作需要, 现公开招聘兼职英文编辑 1 ~ 2 名。条件如下:

1. 具有硕士以上学位, 动物或微生物分子遗传学专业背景, 在国内外学术期刊发表过英文研究论文。
2. 具有在英语国家工作和生活的经历, 英语熟练, 语法准确, 口语流畅。
3. 熟练使用计算机和编辑软件。
4. 不用座班, 网上审稿, 兼职从事《遗传学报》、《遗传》新录用稿件的英文审查修改与润色, 按工作量计发报酬。需要时代表编辑部参加国际会议, 组稿约稿。补贴差旅费, 按约稿量发放奖励。

符合条件的应聘者, 请向《遗传学报》编辑部报名, 网上提交个人相关信息 (E-mail: ycxb@genetics.ac.cn, 中、英文各一份)。来信必复, 择优考核, 试用后签署聘用协议。

《遗传学报》《遗传》编辑部

2006 年 3 月 6 日