

大熊猫 DNA 序列变异及其遗传多样性研究*

张亚平

(中国科学院昆明动物研究所细胞与分子进化开放研究实验室, 昆明 650223)

Oliver A Ryder

范志勇 张和明 何廷美

(Zoological Society of San Diego, San Diego, CA92112)

(中国林业部, 北京 100714)

何光昕 张安居 费立松 钟顺隆 陈 红

(成都动物园, 成都 610081)

张成林 杨明海 朱飞兵 彭真信 普天春

(北京动物园, 北京 100044)

陈玉村

姚敏达 郭 伟

(福州大熊猫研究中心, 福州 350001)

(重庆动物园, 重庆 630050)

摘要 测定了来自马边、美姑、越西、宝兴、平武、青川、南坪和白水江等地 40 只大熊猫 336~444 bp 的线粒体 tRNA 基因和 D 环区序列。在 21 个创立者中共检出 9 种线粒体 DNA 单倍型。发现大熊猫的遗传分化程度很低, 地理群体间无显著的遗传隔离。大熊猫现生群体可能源于晚更新世, 并受瓶颈效应的影响。在此之后, 其遗传多样性得到了一定程度的恢复。

关键词 大熊猫 线粒体 DNA 序列 遗传多样性 保护

大熊猫(*Ailuropoda melanoleuca*)属熊超科大熊猫科^[1], 是世界上最有影响和最受欢迎的动物。由于人类社会经济活动的影响, 大熊猫栖息地受到严重破坏而急剧萎缩, 单调的食物来源逐渐枯竭, 加之自身的生殖力又较为低下, 其数量已极为稀少, 大约仅存 1 000 只, 且割裂为小群体, 处于极度濒危的状态^[2]。大熊猫的保护受到国际社会的广泛关注和我国政府的高度重视。准确了解大熊猫遗传多样性程度及其群体遗传结构, 是制定经济有效的保护对策的基础。宿兵等通过研究 12 只大熊猫的蛋白电泳, 发现其遗传多样性贫乏^[3]。但是, 蛋白电泳的灵敏度有限, 选择更为灵敏的研究方法, 深入研究更多的个体无疑是十分必要的。

线粒体 DNA 是研究动物群体遗传结构及遗传多样性有效的标记^[4], 而进化速度最快的 D 环区 DNA 序列的分析, 则是群体遗传研究中最有效和最灵敏的方法之一。本文拟测定并分析来自大熊猫不同群体的线粒体 DNA D 环区的序列, 为大熊猫保护中的遗传管理提供科学依据。

1995-12-05 收稿, 1996-03-05 收修改稿

* 国家杰出青年科学基金、中国科学院“八五”重大项目基金、王宽诚基金、云南省应用基础研究基金、云南省中青年人才培养计划、国家自然科学基金和留学回国人员择优支持基金、Zoological Society of San Diego 和 John D. MacArthur Foundation 的资助项目

1 材料和方法

1.1 样品

大熊猫共 40 只, 分别为肝脏、心脏、肺、血液或毛发组织。其中 2 只来自马边, 1 只来自美姑, 2 只来自越西, 11 只来自宝兴(8 只捕获自野外, 其余 3 只的母亲捕获自野外), 1 只来自平武, 2 只来自青川(捕获自野外和其母亲捕获自野外的各 1 只), 1 只来自南坪, 1 只来自白水江。其余 19 只是上述大熊猫的后代或与上述大熊猫来自共同的母亲。

1.2 DNA 的提取及 PCR 扩增

肝脏、心脏、肺和血液组织 DNA 的提取按照 Zhang 和 Ryder 的方法^[1], 毛发 DNA 的提取则按照 Zhang 等的方法^[5]。

我们采用 PCR 定点扩增线粒体 DNA D 环区序列。PCR 引物两对:(1) L15926 (5'-TCAAAGCTTACACCAGTCTGTAAACC-3')/H16498 (5'-CCTGAACCTAGGAACCAGATG-3')^[6], (2) 根据 Zhang 和 Ryder(1994)D 环区序列^[6]设计的大熊猫特异的引物, L748(5'-AGACTCAAGGAAGGAGAAC-3')/H1142(5'-CGGAGCGAGAAGAGGTACACGTAC-3'), 引物名称中的数字表示在该文献^[6]DNA 序列中的位置。扩增片段在第 1 对引物扩增的区域内。这对引物主要用于扩增毛发 DNA。

PCR 扩增条件参照 Zhang 和 Ryder 的办法^[6], 运行 40 个循环。

1.3 DNA 序列测定及数据分析

我们采用热变性法直接测定由 PCR 扩增而来的双链 DNA 的序列^[1]。DNA 序列仪来自美国 CBS 科学公司(型号 SG-500-33)。用 PC/GENE 6.0 版本程序对同源 DNA 序列进行排序。在此基础上以 PAUP 程序作支序分析, 确定线粒体 DNA 单倍型间的亲缘关系。

2 结果与讨论

2.1 样品来源

在 40 个样品中, 我们视每一个来自野外的个体为一个线粒体基因组创立者。对于人工繁殖的个体, 考虑到线粒体 DNA 的母系遗传特性, 我们仅按照它们来自野外的母亲的数量计算创立者。由此可看出, 40 个样品包括了 21 个线粒体基因组创立者, 并代表了除秦岭和相岭以外的大小凉山、邛崃、岷山等所有主要山系的大熊猫群体。

2.2 DNA 序列变异

对于每个个体, 我们测定了 336~444 bp 的线粒体 tRNA 基因和 D 环区序列。在 tRNA 基因内未观察到序列变异, 因此, 在分析中将忽略这部分序列。

在 21 个创立者中, 共检出 9 种线粒体 DNA 单倍型。这 9 种单倍型 318 bp 的 D 环区序列的排序见图 1。有 3 个位点出现转换, 2 个位点出现缺失/插入。未检出颠换。由此可看出, 在我们研究的大熊猫序列中, 转换发生的频率远高于颠换。9 种单倍型间序列变异的情况见表 1。值得注意的是, 在熊超科 D 环区存在一个长达数十至一百余 bp 的缺失/插入区域^[1,6], 显然, 这是功能上不重要因而变异较大的区域。而本文第 87 位的转换、135 位和 137 位的缺失/插入正好位于该区域。同时, 第 135 位和 137 位的缺失/插入发生于(C)_n 重复序列区, 这两位点的变异可能是由于重复序列区在复制过程中的错配所致。

虽然在 21 个创立者中就检出 9 种线粒体 DNA 单倍型, 即个体间存在变异。但是, 在来自同一母亲的所有个体间却未检出任何序列变异。我们的结果在食肉目动物中进一步证明, 哺

	10	20	30	40	50
GP1	ATACTATAAATCCACCTCTCATTTCATTCACTTCATA	CATGCTATTACAC			
GP2			T
GP3
GP4			T
GP5			T
GP6			T
GP7			T
GP8
GP9			T
	60	70	80	90	100
GP1	ACTCTGTGCCATCATAGTATGTTTCATACATCCTCCCTTCTTCACACC				
GP2			T
GP3
GP4
GP5
GP6			T
GP7
GP8
GP9			T
	110	120	130	140	150
GP1	CTATGTATATCGTACATTAATGGTGTACCCCCCCC-T-CCC	CCTATGTATA			
GP2			-C
GP3			C.C.
GP4			C.C.
GP5			-C
GP6			-C
GP7			-C
GP8			-C
GP9			C.C.
	160	170	180	190	200
GP1	TCGTGCATTAATGGCGTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATACTGTGCT				
GP2
GP3
GP4
GP5
GP6
GP7
GP8
GP9
	210	220	230	240	250
GP1	TGGCTTTACATGAGGAACTCATTACAAGAACCTATTCAAGCGATAGTC				
GP2
GP3
GP4
GP5
GP6
GP7
GP8
GP9

图 1 大熊猫线粒体 DNA 单倍型 D 环区序列的排序

— 表示缺失, • 表示与单倍型 1 的序列相同

	260	270	280	290	300	
GP1	TATGAGCATGTATTC	ACTTAGTCCAAGAGCTT	GATCACCAAGCCTCGAG			
GP2	
GP3	
GP4	
GP5	
GP6	
GP7	G	
GP8	
GP9	
	310					
GP1	AAACCAGCAATCCTTGCG					
GP2	
GP3	
GP4	
GP5	
GP6	
GP7	
GP8	
GP9	

图 1(续)

乳动物线粒体 DNA 遵循严格的母系遗传方式.

表 1 大熊猫线粒体 DNA 单倍型 D 环区序列的变异^{a)}

线粒体 DNA 单倍型	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1		1	2	2	1	0	1	1	2
2	2		1	1	0	1	0	0	1
3	0	2		0	1	2	1	1	0
4	1		1		1	2	1	1	0
5	1	1	1	0		1	0	0	1
6	1	1	1	0	0		1	1	2
7	3	1	3	2	2	2		0	1
8	0	2	0	1	1	1	3		1
9	1	0	2	1	1	1	1	2	

a) 转换和缺失/插入的总数分别示于对角线以下和以上

2.3 单倍型间的分歧时间

要准确确定大熊猫群体的分化时间十分困难. 但我们可借助分子钟作粗略的估算.

由于北美的棕熊和北极熊有相对好的化石记录, 这 2 个种的分化大约发生在更新世中期^[7], 因此, 我们可以此为参照. 如上所述, 第 87 位的转换、135 位和 137 位的缺失/插入位于一个特殊的区域, 一般很难准确计算这类位点的变异频率与时间的关系. 为了减少误差, 增强与棕熊和北极熊序列的可比性, 我们在计算时忽略这一特殊区域的序列, 即不考虑这 3 个位点的变异. 在排除这些位点后, 大熊猫单倍型间最大的变异率是 2 次转换. 而在同一区域内, 棕熊与北极熊间的变异率是 14 次转换. 由此可看出, 大熊猫群体(除秦岭群体外)的分化比棕熊和北极熊间的分化约晚 7 倍的时间, 即大约在晚更新世.

一些学者认为, 大熊猫在更新世初期为小型大熊猫; 在更新世早、中期, 体型逐渐增大, 成为最大体型的巴氏亚种, 广泛分布于我国东南地区; 后来体型又稍减, 成为大熊猫现代种^[2,8].

我们计算的大熊猫分化时间与之相吻合。看来,大熊猫现生群体起源于晚更新世。

2.4 群体内和群体间的遗传结构

我们采用 PAUP 软件作支序分析,试图确定各单倍型间的亲缘关系。在分析中,我们赋予转换和缺失/插入等同的加权值。共得到 93 个枝长为 8 的最简约的系统树。这 93 棵树的严格一致(strict consensus)未能确定单倍型间的相互关系。我们的结果提示,没有哪两种单倍型间的亲缘关系较与其它的显著地近。

线粒体 DNA 各种单倍型在不同地理群体中的分布见表 2。由表中可看出,单倍型的分布无明显的地理区域性。凉山、邛崃和岷山山系的群体共同享有单倍型 1。同时,同一山系的单倍型间未显示较近的亲缘关系。对于宝兴群体,我们测定了 11 个创立者的序列,共检出 4 种 DNA 单倍型;而对于所有山系的混杂群体,在 21 个创立者中共检出 9 种单倍型。换言之,群体内和群体间的线粒体 DNA 单倍型的检出率相似。我们的这些结果都表明,大熊猫群体间尚无明显的遗传隔离,群体内和群体间的遗传分化程度处于相近的水平。

表 2 线粒体 DNA 单倍型在各大熊猫地理群体中的分布

地理来源	创立者编号	线粒体 DNA 单倍型	地理来源	创立者编号	线粒体 DNA 单倍型
马边	Z0312	6		Z0202	7
	ZM001	6		Z0308	2
美姑	Z0278	1		Z0329	1
	Z0343	1		Z0358	2
越西	Z1G18	4		ZB002	2
	Z1G04	1		Z1010	8
宝兴	ZB001	5	平武	Z0310	9
	Z1009	1		Z0230	9
	Z1078	7	青川	Z0180	3
	Z1095	5		Z0100	1
	Z0148	1	白水江		

2.5 群体的遗传多样性

我们曾研究了棕熊、亚洲黑熊、北极熊和马来熊群体的遗传多样性(张亚平等,待发表)。除马来熊外,在前 3 个种的细胞色素 b 基因区域内均检出了一定数量的序列变异,提示马来熊的遗传多样性程度还较北极熊的低。而北极熊是公认的遗传多样性程度较低的哺乳动物。即使是在马来熊线粒体 DNA D 环的相应区域内,最高的序列变异达 8 次转换,远高于大熊猫的 3 次转换。我们的结果进一步从 DNA 水平证明,大熊猫群体的遗传分化程度的确很低^[3]。

另一方面,我们在 21 个个体中就检出 9 种线粒体 DNA 单倍型。换言之,大熊猫存在广泛的个体间遗传变异。这与很低程度的遗传分化形成鲜明对比。同时,群体内和群体间的遗传多样性程度处于相近的水平。

上述大熊猫遗传多样性特殊格局可能的原因是:(1)我们的方法十分灵敏,个体间一旦存在变异就易被检出;(2)大熊猫在晚更新世受到“瓶颈效应”的严重影响,形成较为均一的遗传背景。后来,随着群体的逐渐增大,遗传多样性得到一定程度的恢复。(3)大熊猫在相当一段时间内存在足够大的有效群体,且群体间在晚近仍有充分的基因流。而大熊猫群体缩小、割裂分布的现状可能主要是由于人类社会经济活动的影响所致。

2.6 保护中的意义

大熊猫现在仅存约 1 000 只, 分布于秦岭、岷山、邛崃山、大相岭、小相岭和大小凉山等彼此分割的 6 个区域。更为严重的是, 由于高山、河流等自然因素, 特别是公路、村庄、耕地等人为因素的影响, 每个区域又被分割。这些分离的小群体, 除卧龙外, 一般不到 50 只, 有的仅 10 余只^[2]。长此下去, 这些小群体势必由于近亲交配, 导致纯合度的增加和遗传多样性的丢失, 最终失去进化潜力而走向灭绝。为了降低近亲交配, 抑制遗传多样性的丢失, 一些专家建议修建人工走廊, 以促进群体间的基因流。一种方案是仅建立大区域内的走廊, 沟通割裂的小群体; 另一种方案还要建立大区域间的走廊。后者难度极大, 代价昂贵, 效果也难预测。

我们的结果表明, 大熊猫大区域间似无显著的遗传分化。看来, 修建大区域间的人工走廊, 对于增进大熊猫的遗传多样性可能不会产生显著的意义。我们认为, 在现阶段修建大区域内的人工走廊较为可行, 意义也更为重大。

从大熊猫的进化中可看出, 只要维持一定的群体大小, 大熊猫的遗传多样性是可逐渐恢复的。因此, 只要我们保护好, 并在一定程度上恢复扩大大熊猫的栖息地, 逐渐增大其群体, 大熊猫是可挽救的。

参 考 文 献

- 1 Zhang Y P, Pyder O A. Mitochondrial DNA sequence evolution in the arctoidae. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90: 9 557~9 561
- 2 胡锦矗. 大熊猫生物学研究进展. 成都: 四川科学技术出版社, 1991
- 3 宿 兵, 施立明, 何光昕, 等. 大熊猫遗传多样性的蛋白电泳研究. *科学通报*, 1994, 39(5): 742~745
- 4 张亚平, 施立明. 动物线粒体 DNA 多态研究的回顾与展望. *动物学研究*, 1992, 13: 289~298
- 5 Zhang Y P, Ryder O A, Zhao Q G, et al. Noninvasive giant panda paternity exclusion. *Zoo Biol*, 1994, 14: 569~573
- 6 Zhang Y P, Ryder O A. Phylogenetic relationships of bears (the Ursidae) inferred from mitochondrial DNA sequences. *Mol Phylogenet Evol*, 1994, 3: 351~359
- 7 Kurten B, Anderson E. Pleistocene mammals of North America. New York: Columbia Univ Press, 1980
- 8 王将克. 关于大熊猫的划分、地史分布及其演化历史的讨论. *动物学报*, 1974, 20: 191~201