

白头叶猴线粒体 ND4基因和 D-环区的序列及其分类地位初探*

Preliminary Studies on the Classification of *Trachypithecus francoisi* based on mitochondrial ND4 and D-Loop DNA

刘自民 韦毅

Liu Zmin Wei Yi

麻秀珍

Ma Xiuzhen

(广西区林业厅野生动植物和
自然保护区管理站 南宁市七星路 530022)(中华人民共和国南宁动物
检疫所 南宁 530001)(The Wildlife and Nature Reserve Managing station of Guangxi (Nanning Animal Quarantine Service of
Department of Forestry, Qixing Road, Nanning, Guangxi, 530022) P. R. China, Nanning, 530001)

王 文 陈永久 张亚平

Wang Wen Chen Yongjiu Zhang Yaping

(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 云南昆明 650223)

(Laboratory of Cellular and Molecular Evolution, Kunming

Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Kunming, Yunnan, 650223)

摘要 用 PCR(多聚酶链式反应)扩增方法测定白头叶猴、黑叶猴和菲氏叶猴各 1 只的线粒体 DNA ND4 整个基因 (1377 bp) 和 D-环 500 多 bp 序列。黑叶猴与菲氏叶猴的 ND4 基因序列碱基差异数高达 123, 基于 ND4 基因的遗传距离值为 8.9%; 白头叶猴与黑叶猴 ND4 基因序列间碱基差异数为 25, 遗传距离值为 1.8%。在 D-环区域, 白头叶猴与黑叶猴间的遗传距离为 4.3%, 而白头叶猴、黑叶猴两者与菲氏叶猴间的遗传距离则分别高达 26.4% 和 26.0%。分析结果表明, 白头叶猴恐怕还只是黑叶猴的一个亚种。从保护遗传学角度看, 白头叶猴应被看作一个进化显著性单元 (evolutionary significant units, ESU), 在动物的保护行动中应得到充分的重视。

关键词 白头叶猴 ND4 序列 D-环序列 分类地位

Abstract Mitochondrial ND4 (1377 bp) and D-Loop DNA (500 bp) sequences were employed for estimating phylogenetic relationships among white-head leaf monkey, black leaf monkey, and phayrei leaf monkey. The variable sites and genetic distance of ND4 sequences between black leaf monkey and phayrei leaf monkey were 123, and 8.9% respectively, while those between white-head leaf monkey and black leaf monkey were 25, and 1.8%. Mitochondrial D-Loop DNA was characteristic by evolving faster. Based on D-Loop DNA analysis, the genetic distance between white-head leaf monkey and black leaf monkey was 4.3%, while those between white-head monkey and black leaf monkey were 26.4%, and 26.0% respectively. So far the black leaf monkey and phayrei leaf monkey have been valid species. Our studies implied that white-head leaf monkey should be a subspecies of black leaf monkey, but it should be a evolutionary significant units (ESU), which should be taken seriously in genetic conservation.

Key words white-head leaf monkey, ND4 sequence, D-Loop sequence, classification

中图法分类号 Q959.848.09

白头叶猴首先被谭邦杰^[1]于 1955 年发现并作为

一个种, 定名为 *Trachypithecus leucocephalus*。其分类地位至今仍有争议。李致祥和马世来^[2]于 1980 年将白头叶猴定证为黑叶猴 (*Trachypithecus francoisi*)

的一个亚种。许多灵长类学者^[3,4]也接受这一观点,但 Brandon-Jones^[5]于1984年和卢立仁等^[6]于1991年仍然认为白头叶猴是一个有效种。白头叶猴群体数量估计最低仅为40只^[7],最多也不过1400只^[8],且其分布区仅局限在明江、左江和十万大山围成的狭小三角地带^[9,10]。由于其分类地位不明,因而它在动物保护中的地位也难确定,这给白头叶猴的保护工作带来困难。从遗传分子(DNA)角度研究白头叶猴,将有助于确定白头叶猴的分类和保护地位。

线粒体DNA已被证明是研究灵长类系统进化关系的良好的遗传标记^[11-13],而且,动物线粒体DNA为单倍体,无重组,并呈母系遗传。此外,脊椎动物线粒体基因组上的基因排列顺序(图2)高度保守,但DNA序列的取代速度却平均比核基因高10倍^[11],所有这些特点都使线粒体DNA成为系统研究的理想分子标记。由于已观察到脊椎动物线粒体的ND4基因区在种和属水平的进化速度适中^[14-16],而且来自限制性位点的分析表明这一区域的甚至在叶猴的群体水平也有变异^[17],因此,我们选择ND4基因作为我们研究的一个遗传标记。此外,D环作为非编码区是动物线粒体基因组中进化速度最快的一段DNA序列^[18-20],因而特别适合于种内群体水平的研究。Morin等^[21]对黑猩猩社会行为、保护和进化的研究已充分显示了线粒体DNA D环区在保护遗传学中的应用价值。因此,我们也希望利用这一分辨率极高的遗传标记解析白头叶猴与黑叶猴这两种关系极近的分类群间的关系。

1 材料和方法

1.1 材料

白头叶猴与黑叶猴各1只,其血样采自广西扶绥野生动物保护管理站。血样送至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进行DNA提取和DNA序列分析工作。此外,我们还采用1只来自云南的菲氏叶猴(*Trachypithecus phayrei*)作为参考外群。该菲氏叶猴的材料由中国科学院典型培养物保存委员会昆明细胞库提供。

1.2 方法

1.2.1 DNA提取:总DNA的提取依照王文等^[22]的方法进行。具体操作如下:取100 μ L全血,加入500 μ L STE缓冲液(30 mM Tris-HCl, 200 mM EDTA, 50 mM NaCl, pH值8.0)及终浓度分别为1%的SDS和200 μ g/mL的蛋白酶K,充分混合后置56 $^{\circ}$ C作用。消化至透明后加入等体积的水饱和酚,于自制转轮上缓慢转动抽提24 h 5000 \times g离心10 min。取上

清液用苯酚:氯仿混合液(1:1)抽提5 h 5000 \times g离心后取上清液用等体积的氯仿:异戊醇(24:1)抽提1 h 5000 \times g离心后取上清液加入2倍体积的无水乙醇沉淀DNA。DNA干燥后加入适量体积的TE缓冲液(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH值8.0)溶解,保存于-20 $^{\circ}$ C备用。

1.2.2 PCR(多聚酶链式反应)扩增:ND4基因的PCR特异性扩增使用以下一对引物:ND4NewND4M-5'ATA CCC CTA TAT GGY CTA CAC CTA TG3'和Mleu-5'TACTTT-TATTTGGAGTTGCACCA 3'。D环的扩增使用以下一对引物:H15926 5'-TCAAAGCTTACACCAGTCTTGTAAACC-3'^[23]和CJDRev-5'GTCCGTCTAGACATTTTCAGTG-3'。经过优化后的通用PCR反应条件是:94 $^{\circ}$ C变性1 min, 50 $^{\circ}$ C退火1 min, 72 $^{\circ}$ C延伸3 min 30 s,共35个循环后,72 $^{\circ}$ C再延伸10 min。该过程在Stratagene公司的Robocycler Gradient 40温度循环仪上进行。PCR产物用常规的低熔点胶法^[24]进行纯化。

1.2.3 DNA序列的测定:纯化的PCR产物直接用作双链热循环测序反应的模板。热循环测序反应使用Applied Biosystems Inc.的DyeDeoyTM Terminator Cycle Sequencing试剂盒(#401434)进行。操作过程主要根据厂家推荐的方法进行。

使用Applied Biosystems Inc.的377 PRISM全自动DNA序列仪电泳并记录序列数据。控制软件为PRIM 377 Collection 1.1。

1.2.4 数据分析得到序列后,以人线粒体DNA同源区域^[25]为参照,在PAUP3.0^[26]软件的编辑状态下将得到的每一个序列排定,并利用PAUP3.0软件计算两两DNA序列间差异的百分数(即遗传距离)。

2 结果与讨论

白头叶猴、黑叶猴以及作为参考的菲氏叶猴和人的ND4基因序列见图1, D环区的部分序列见图2。

从表1和表2可以看出,黑叶猴与菲氏叶猴这两个公认物种的ND4基因序列碱基差异数高达123,基于ND4基因的遗传距离值也达8.9%;但白头叶猴与黑叶猴ND4基因序列间碱基差异数仅为25,遗传距离也仅为1.8%。即便在D环这一进化速度最快的区域,白头叶猴与黑叶猴间的遗传距离也仅为4.3%,而白头叶猴、黑叶猴两者与菲氏叶猴间的遗传距离则分别高达26.4%和26.0%。从以上分析看来,白头叶猴恐怕还只是黑叶猴的一个亚种。

表1为白头叶猴、黑叶猴、菲氏叶猴和人ND4基

因之间序列差异的碱基数和遗传距离值 表 2 列示了 D 环的序列差异数和遗传距离值。

表 1 基于 ND4 基因的碱基差异数 (对角线下) 和遗传距离值 (对角线上)

Table 1 The variable sites (below the line) and the genetic distance (above the line) of ND4 sequence

	人 Men	白头叶猴 <i>T. f.</i> <i>leucocephalus</i>	黑叶猴 <i>Trachypithecus</i> <i>francoisi</i>	菲氏叶猴 <i>T. phayrei</i>
人 Men	-	0.234	0.232	0.235
白头叶猴 <i>T. f.</i> <i>leucocephalus</i>	322	-	0.018	0.085
黑叶猴 <i>Trachypithecus</i> <i>francoisi</i>	320	25	-	0.089
菲氏叶猴 <i>T. phayrei</i>	323	117	123	-

表 2 基于 D 环区约 500 bp 长的序列得到的碱基差异数 (对角线下) 和遗传距离值 (对角线上)

Table 2 The variable sites (below the line) and the genetic distance (above the line) of D-Loop (500bp) DNA sequence

	白头叶猴 <i>T. f.</i> <i>leucocephalus</i>	黑叶猴 <i>Trachypithecus</i> <i>francoisi</i>	菲氏叶猴 <i>T. phayrei</i>
白头叶猴 <i>T. f.</i> <i>leucocephalus</i>	-	0.043	0.264
黑叶猴 <i>Trachypithecus</i> <i>francoisi</i>	22	-	0.260
菲氏叶猴 <i>T. phayrei</i>	136	134	-

在生物保护中, 有一个称作进化显著性单元 (evolutionary significant units, ESU) 的概念^[27-30]。目前它被认为是物种保护的基本单位。它主要是指一些有着特殊遗传背景的群体, 如已被确认的亚种。因此从这一意义来说, 白头叶猴应被看作一个 ESU, 而且由于其小的种群数量和狭窄的地理分布, 在动物的保护行动中应得到充分的重视。

当然, 我们这一工作还只是初步性的。目前涉及更多个体的工作仍在深入进行中。

致谢

感谢以刘瑞清教授为主任的中国科学院典型培养物保存委员会昆明细胞库提供菲氏叶猴的材料。

- 谭邦杰. 我国的猿猴. 生物学通报, 1955, 55 (3): 34
- 李致祥, 马世来. 白头叶猴的分类订正. 动物分类学报, 1980, 5: 440-442.
- Eudey A A. Action plan for Asian primates conservation. 1987~1991. Internl. Union Conserv. Nat., Gland, Switzerland. 1987.
- 李汉华, 申兰田. 广西的白头叶猴. 广西师范学院学报, 1982, 1: 27-32.
- Brandon-Jones D. Colobus and leaf monkeys. In: Macdonald D. (eds.). The enclopaedia of mammals. Allen and Unwin, London, 1984, 1: 398-410.
- 卢立仁, 李兆元. 论白头叶猴的分类. 广西师范大学学报, 1991, 9 (2): 67-70.
- 王应祥, 蒋学龙. 中国灵长类研究的现状与未来. 见: 夏武平和张荣祖编. 灵长类研究与保护, 北京: 中国林业出版社, 1995. 1-14.
- 刘万福, 韦振逸. 广西灵长类资源与保护. 见: 夏武平和张荣祖编. 灵长类研究与保护. 北京: 中国林业出版社, 1995. 123-132.
- 谭邦杰. 论中国的猿猴. 大自然, 1981, (1): 26-29.
- 李兆元. 中国叶猴的分类及地理分布. 见: 叶智彰主编, 叶猴生物学, 昆明: 云南科技出版社, 1993. 19-26.
- Brown WM. Evolution of mitochondrial DNA. In: Nei M, Koehn R K (eds.). Evolution of Genes and Proteins. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, 1983. 62-68.
- Melnick D J, Hoelzer G A, Honeycutt RL. Mitochondrial DNA: its uses in Anthropological research. In: Devor EJ (ed). Molecular applications in biological anthropology. Cambridge: Cambridge University Press, 1992. 179-233.
- Melnick D J, Hoelzer G A. What is mtDNA good for in the study of primate evolution? Evolutionary Anthropology, 1993, 2: 191-199.
- Cracraft J, Helm-Bychowski K. Parsimony and phylogenetic inference using DNA sequences: some methodological strategies. In: Miyamoto M M, Cracraft J (eds.). Phylogenetic Analysis of DNA Sequences, New York: Oxford Univ. Press, 1991. 184-220.
- Arevalo E, Davis S K, Sites J W. Mitochondrial DNA sequence divergence and phylogenetic relationships among eight chromosome races of the *Sceloporus grammicus* complex (Phrynosomatidae) in central Mexico. Syst Biol, 1994, 43: 387-418.
- Forstner M R J, Davis S K, Arevalo E. Support for the hypothesis of Anguimorph ancestry for the suborder serpens from phylogenetic analysis of mitochondrial DNA

- sequences. *Mol Phylogenet Evol*, 1995, 4: 93~102.
- 17 Rosenblum L L, Melnick D J. A comparison of mitochondrial DNA variation in *Macaca nemestrina* and *Presbytis cristata*. *Amer J Phys Anthropol*, 1994, 18: 173~174.
 - 18 Upholt W B, Dawid I B. Mapping of mitochondrial DNA of individual sheep and goats: rapid evolution in the D-loop region. *Cell*, 1977, 11: 571~583.
 - 19 Walberg M W, Clayton D A. Sequence and properties of the human KB cell and mouse L cell D-loop regions of mitochondrial DNA. *Nucleic Acid Res*, 1981, 9: 5411~5421.
 - 20 Chang D D, Clayton D A. Proming of human mitochondrial DNA replication occurs at the strand promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985, 82: 351~355.
 - 21 Morin P A, Moore J J, Chakraborty R et al. Kin selection, social structure, geneflow, and the evolution of chimpanzees. *Science*, 1994, 265: 1193~1201.
 - 22 王文, 兰宏, 宿兵等. 云南4种少数民族的随机扩增多态DNA分析. *科学通报*, 1994, 39: 1900~1903.
 - 23 Kocher T D, Thomas W K, Meyer A, Edwards SV et al. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86: 6192~6200.
 - 24 Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. *Molecular cloning—a laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
 - 25 Anderson S, Bankier AT, Barrell B G, et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, 1981, 290: 457~465.
 - 26 Swofford D L. PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony. Illinois Natural History Survey, Champaign, IL, 1991. version 3. 1. 1.
 - 27 Ryder O A. Species conservation and systematics: the dilemma of subspecies. *Trends Ecol Evol*, 1986, 1: 9~10.
 - 28 Moritz C. Applications of mitochondrial DNA analysis in conservation: a critical review. *Mol Ecol*, 1994, 3: 401~411.
 - 29 Moritz C. Defining evolutionarily significant units for conservation. *Trends Ecol Evol*, 1994, 9: 373~375.
 - 30 Moritz C. Use of molecular phylogenies for conservation. *Phil Trans R Soc Lond*, 1995, B349: 113~118.

(责任编辑: 蒋汉明)

(上接第60页 Continue from page 60)

男性肝癌发病率均高于女性, 而且愈是肝癌高发区, 男女性比值愈大。在肝癌低发区, 男女性比值一般均小于2:1, 而在肝癌高发区, 则在3:1左右。如我国是2.47:1, 上海为2.88:1, 江苏启东为3.61:1^[5]。而扶绥2年来的资料显示, 男、女肝癌发病率的平均性比值为4.48:1 (3.02:1~7.81:1), 性比值明显高于国内外其他地区, 同时, 性比值有逐渐增大趋势。这或许与近年来扶绥女性肝癌发病率有显著下降, 而男性下降不明显有关, 深入剖析这一现象, 将是肝癌病因学和肝癌防制战略研究面临的新课题。

参考文献

- 1 卫生部肿瘤防治研究办公室. 中国恶性肿瘤死亡调查研究. 北京: 人民卫生出版社, 1979.
- 2 李冰, 黎均耀. 中国恶性肿瘤的情况与分布特点. *中华肿瘤杂志*, 1980, 2(1): 1.
- 3 中华人民共和国卫生部. “九五”全国肿瘤防治计划. *中国肿瘤*, 1995, 11: 3.
- 4 Shanghai international symposium on liver cancer and hepatitis (Abstracts). 1986.
- 5 Tang ZY, Wu MC, Xia SS (Eds). *Primary liver cancer*. Springer-Verlag Berlin, China Academic Publishers, 1989.

(责任编辑: 蒋汉明)