

线粒体 DNA 在分子生态学中的应用

都玉蓉^{1,2,3}, 马建滨³, 苏建平^{1*} (1.中国科学院西北高原生物研究所, 青海西宁 810008; 2.中国科学院研究生院, 北京 100049; 3.青海师范大学生命与地理科学学院, 青海西宁 810008)

摘要 概括了线粒体 DNA (mtDNA) 的特点与其作为遗传标记的优越性, 着重回顾了该分子标记在分子生态学多个研究领域的应用, 并阐述了其在青藏高原生物多样性、分子系统地理学研究中的应用前景。

关键词 线粒体 DNA; 分子生态学; 青藏高原

中图分类号 Q78 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2007)20-06047-03

Application of Mitochondrial DNA in Molecular Ecology

DU Yu-rong et al (Northwest Plateau Institute of Biology, Chinese Academy of Science, Xining, Qinghai 810001)

Abstract Characters and advantages of mitochondrial DNA were summarized. Its application in some research fields related with molecular ecology was reviewed. Meanwhile, its application perspective in genetic diversity and molecular phylogeography in Qinghai-Tibetan plateau was presented.

Key words Mitochondrial DNA; Molecular ecology; Qinghai-Tibetan plateau

分子生态学运用分子标记来检测研究对象的遗传变异特征, 以揭示生物所隐含的演化规律, 其研究方法的全面引入, 使许多宏观生态学问题, 特别是种群生态学、进化生态学、行为生态学和保护生态学问题的研究从理论机制到实践操作等方面都获得了长足进展。生物种群的变化反映在 DNA 上就是其序列的变化, DNA 作为生物进化历史的忠实记录者, 从其本身探索生物进化的理论、生物类群的演化历史具有重要的意义。

1 线粒体 DNA (mtDNA) 的特点

自 Nass 等 (1963) 发现线粒体中含有 DNA 以来^[1], 线粒体中存在遗传物质的事实逐渐为人们所接受。随后, 关于线粒体 DNA (Mitochondrial DNA, mtDNA) 结构与遗传特性的研究工作迅速展开, 获得了大量资料, 并证明线粒体是半自主性细胞器。随着分子生物学技术的发展, mtDNA 分析迅速渗入传统的分类、系统进化、群体遗传及人类学等研究领域, 成为生态学研究领域的强有力工具之一。1981 年, 剑桥大学 Anderson 等人在《Nature》上发表了人类 mtDNA 分子的测序结果, 其全长为 16 569 bp, 该序列也被称为剑桥序列 (CRS, Accession number: NC_001807)^[2]。迄今为止, 已有 100 余种脊椎动物的 mtDNA 全序列被测定、公布; 此外, 还有许多动物 mtDNA 的部分序列被测定。

mtDNA 的大小和结构在脊椎动物中十分保守, 作为系统发生和群体进化研究的分子标记, 它具有如下特点: 严格的母性遗传^[3], 无重组及其他遗传重排现象^[4], 后代能完整地保存祖先的遗传信息, 同时避免了产生混杂遗传信息的可能。mtDNA 属细胞质遗传系统, 但在有性生殖中, 精子对细胞质贡献的可能性不足 0.004%。一级结构进化活跃、速度快, 积累的变异多。mtDNA 的碱基替代率是单拷贝核基因组的 5~10 倍^[5], 这使得 mtDNA 能在较短时间内积累较多的突变, 形成群体特异的遗传标记, 提高了 mtDNA 的信息量和分辨率。此外, mtDNA 的不同区域进化速率存在差异, 这允许

选择不同的区段进行不同时间尺度的进化分析。同一个体组织中 DNA 的等同性。在所有哺乳动物和绝大多数的脊椎动物中, 个体内的 mtDNA 具有高度的专一性, 一般无组织特异性。多态性的 mtDNA 序列歧异普遍存在于物种内甚至同一种群中的个体间。单个细胞内拷贝数多, 分子结构简单, 分子较小。已发表的线粒体全序列测定工作表明, 脊椎动物线粒体基因组的长度大多在 16 kb 左右, 且基因排列紧密, 没有或很少含有间隔序列, 所有基因无内含子, 易于测序与分析, 使工作量相对减少。有效群体大小 (Effective Population Size) 仅为核 DNA 的 1/4^[6]。

2 mtDNA 的应用

2.1 mtDNA 与生命进化研究

生命进化一直是人们所关注的热点, 也是整个生命科学的中心。mtDNA 作为一种分子工具在进化研究中具有不可替代的作用, 并由此产生了一些具有重要意义的成果。Cann 等对来自世界各地 147 例个体的 mtDNA RFLP 数据进行了分析, 结果显示所有个体聚为 2 支, 最古老的一支全部为非洲人, 其他大洲和一部分非洲人的 mtDNA 分布在衍生的另外一大支里, 研究者据此提出了著名的“非洲夏娃”学说, 认为现存各大洲 mtDNA 的共同祖先在非洲。大约 10 万~20 万年前, 部分非洲现代人走出非洲并代替了当地古人类, 成为目前各大洲现代人的祖先^[7]。人类进化研究中另一项重要的结果来自 Wallace 小组的工作, 他们利用 9 个 PCR 扩增片段和 14 种限制酶的酶切分析建立了一套沿用至今的 RFLP 分析系统, 通过这一系统发现了很多具有大洲特异性的单倍群 (Haplotype group, haplogroup), 为揭示世界各地人群的起源和迁徙提供了重要的信息。1997 年, 德国慕尼黑大学 Paabo 领导的研究小组和美国宾夕法尼亚大学的同行们对 Neandertal 人进行了研究。他们从距今 5 万年的 Neandertal 人标本中获得了 378 bp 的 mtDNA, 通过与现代人类基因的对比, 从遗传学角度上认为 Neandertal 人与现代人的祖先相距甚远, 是介于现代人和黑猩猩之间的过渡类型。他们认为, 早在 50 万~60 万年前 Neandertal 人的祖先就与人类祖先在系统发育树上分离, 因此 Neandertal 人不是人类祖先, 并支持现代人非洲起源说^[8,9]。除此之外, mtDNA 还广泛应用于其他物种的进化研究之中, 如猛犸象^[10]等。

基金项目 青海省重大科技攻关项目 (NO.20022N2105); 中国科学院知识创新工程领域前沿项目 (CXLY2200323)。

作者简介 都玉蓉 (1968-), 青海吉宁人, 在读博士, 副教授, 从事保护生物学研究。* 通讯作者。

收稿日期 2007-05-08

2.2 mtDNA 与遗传多样性、分子系统地理学研究 物种的遗传多样性是生命进化和适应的基础,种内遗传多样性愈丰富,物种对环境变化的适应能力愈大。种内遗传多样性的保持也有助于保持物种和整个生态系统的多样性,减慢由于适应和进化所导致的灭绝过程。mtDNA 作为一种遗传标记,是研究遗传多样性及遗传结构的有效工具。张亚平等对 40 只大熊猫线粒体 tRNA 及 D-loop 区进行了序列测定,发现大熊猫中存在着广泛的个体间遗传变异,但群体间的遗传分化程度很低,同时发现群体内和群体间的遗传多样性处于相近水平^[11]。意大利撒丁蝶螈被 IUCN 列为濒危物种,Leclis 等测定了其 4 个种群共 74 个样本的部分 mtDNA 序列,在 915 bp 长的 DNA 序列中共存在 19 个多态位点,以此定义的 22 种单倍型序列分歧度在 0.11%~1.85% 间,平均核苷酸多样性为 0.0045 ± 0.0025 ,4 个群体的平均单倍型多样性为 0.7927 ± 0.0479 ,其中东中部群体为 0,而南部群体则高达 0.9216 ± 0.0391 ; AMOVA 得出群体间遗传变异占 37.5% ($F_s=0.37517$),表明群体间存在着显著遗传结构,同时指出其南部、北部、中部种群应该划分为不同的管理单元 (Management Unit, MU)^[12]。

分子系统地理学是在生物地理学的基础上,采用分子生物学技术手段,从分子水平研究有密切亲缘关系的种间或种内种群间现有系统地理格局形成过程和形成机制,阐述物种现有种群分布形成的历史原因以及遗传多样性分布式样的学科^[13-14]。结合古生物资料、地质资料、孢粉资料和化石资料等,分子系统地理学甚至可以明确、验证历史上地质事件的假设。目前,分子系统地理学已成为国际上相当活跃的研究领域,以 mtDNA 为遗传标记,在研究水系变迁、确定生物冰期避难所及鉴别冰期后扩张或迁移模式、解释种群分布格局形成的历史原因以及阐述驱动物种进化的机制等方面发挥了重要作用^[15-16]。

2.3 研究家畜(禽)起源、驯化历史及物种历史 家畜(禽)的驯化与人类活动密切相关,在改变人类的生活方式上起重要作用,它很大程度上降低了人类对外界环境的依赖,使人类建立定居地及扩展生存空间成为可能,而且也是人类文明产生、延续的先决条件^[17-18]。随着生物技术的发展,在研究家畜(禽)何时、何地、何地被驯化等起源问题上,mtDNA 因能提供丰富的遗传信息^[19]而被广泛用作研究该问题的工具。通过不同种群 mtDNA 多态性的比较,并结合地质变迁的资料,不仅可阐明现今种群相互间的亲缘关系,而且还可推测家畜的起源、分化和扩散途径。采用测序技术,Troy 等测定了 392 头欧洲、非洲、近东现存家牛及 4 头野牛的部分 D-loop 序列,通过构建邻距离系统发生树、序列间 Network 图及分析单倍型、核苷酸多样性,认为欧洲原牛 (*Bos taurus*) 驯化于西亚地区^[20],与 *Loftus* 等以微卫星为标记得到的结论相符^[21]。利用类似的分析方法,Svalainen 等得出狼驯化为狗的地点为东亚,时间大约在 15 000 年前^[22]。此外,mtDNA 还被广泛应用于猪、绵羊、山羊、鸡、马、驴、水牛及牦牛等的驯化起源研究^[16,23-26]。

2.4 确定种内、种间系统发生关系 根据物种间 mtDNA 序列比较分析所得到的数据及 mtDNA 歧异度,通过系统发育分析,可以揭示物种间的系统发育关系、分歧年代和进化过程等。王江以 Cyt b 序列构建的四川藏原羚、斑羚、鬃羚、内蒙古黄羊及其他 31 个牛科物种的系统发育关系表明:原羚

属与羚羊亚科赛加羚羊属、犬羚属及跳羚属等并系发生,为羚羊亚科下的姊妹群;羚羊亚科组成属间除印度羚羊属和羚羊属(仅 NJ, ML 树)单系起源外,其余为并系起源;黄羊和藏原羚分歧时间大约为 100 万~200 万年(Cyt b 分子钟)^[27]。Xu 等在测定印度独角犀 mtDNA 全长序列的基础上,推算出独角犀与马科动物的进化分歧大约发生在 5 千万年前^[28]。mtDNA 作为一种遗传标记还成功用于解决鸟类系统发生关系的研究^[29-33]。马达加斯加岛上的 Scincinae 亚科共存在 8 个属 57 种蜥蜴,由于在进化过程中这些蜥蜴的肢长普遍缩短,给依据形态学差异来确定彼此的进化关系造成一定困难,Schmitz 等以 mtDNA 序列检验了该亚科最大的亚属 *Amphiglossus* 的系统发育关系,发现该亚属分为两支,且这两支分别与其他属的物种构成更大的分支,这与形态学上的该亚属的单系关系不符^[34]。此外,mtDNA 多态性分析还广泛应用于探讨、追踪特异物种的生活史等^[15,32]。

2.5 mtDNA 与保护生物学及分类学研究 mtDNA 分析在保护生物学方面的应用主要有:分析种群的遗传变异,检测数量呈下降趋势种群的遗传变异,弄清形成目前遗传结构的原因;鉴定种群的进化趋异,包括认定进化显著单元 (evolutionary significant units, ESUs);从进化或系统发生的前景评估一个种群栖息地的保护价值。Avise 等认为,mtDNA 的基因系统发育和种群地理信息相结合,可以有效检测种群的遗传结构,并提出相应的保护策略^[13]。张亚平等研究了大熊猫的遗传多样性及群体间遗传分化程度后,提出了现阶段大熊猫的保护策略^[11]。Alves 等(2001)对伊比利亚半岛瓜地亚纳河 9 条支流的鲤鱼样本的 mtDNA Cyt b 和控制区进行测序及 RFLP 分析,认为它们可以划分为 4 个不同的进化显著单元^[35]。Balakrishnan 等在分析了 3 个古鹿亚种 mtDNA 控制区的遗传变异后,认为合理的育种计划对维护管理群体的遗传多样性有积极意义,并建议交换亚种内隔离群体间的个体以维持遗传多样性^[36]。

分类上,宿兵等对我国珍稀灵长类黑冠长臂猿 11 个个体的 mtDNA 的 D-loop 195 bp 片段进行了序列分析,根据由 mtDNA 得到的分子系统树并结合形态学方面的资料,提出对中国黑冠长臂猿新的分类观点^[38]。于宁应用 RFLP 与测序技术对中国鼠兔 21 个物种的种系发生进行研究,纠正并确定了一些鼠兔的分类^[39]。王加连研究 mtDNA D-loop 及对 Cyt b 部分序列进行分析后,认为中国水域的真海豚在分类上应归属于长喙真海豚^[37]。

3 mtDNA 在青藏高原生物多样性研究中的应用前景

生物的遗传多样性是其生存和稳定的物质基础,也是实现其可持续利用的前提条件。青藏高原是全世界海拔最高的生态系统,由于其独特的时空演变特征、生态环境,青藏高原不仅是全球 34 个生物多样性焦点地区之一,而且也是分子系统地理学研究的热点区域之一。目前,以 mtDNA 为分子标记,许多学者在普氏原羚、藏羚羊、青海湖裸鲤等的遗传多样性研究方面做了大量工作,并提出了相应的保护策略;同时,应用分子系统地理学,在阐述青藏高原生物类群演化与青藏高原隆升之间、第四纪冰期关系方面进行了有效尝试^[16,38-40]。然而,青藏高原生物资源丰富,区内很多物种的遗传多样性仍未开展,如野牦牛、藏野驴、大鲵、卤虫等。而且,在分子系统地理学方面,青藏高原隆升、第四纪冰期气候的具体过程及

其对动物分布、遗传分化造成的影响也远未得到系统展开,亟待学者开展更广泛、深入的研究加以阐述与探讨。因此,利用 mtDNA 这一遗传标记开展青藏高原生物的遗传多样性与分子系统地理学研究,将对青藏高原生物资源的保护利用、青藏高原地质与气候环境变迁历史研究产生重大影响。

参考文献

- [1] NASS M M K, NASS S. Intramitochondrial fibres with DNA characteristics. I. Fixation and electron staining reactions [J]. *The Journal of Cell Biology*, 1963, 19: 593-611.
- [2] ANDERSON S, BANKIER A T, BARRELL B G, et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome [J]. *Nature*, 1981, 290(5806): 457-465.
- [3] GILES R E, BLANDH, CANN H M, et al. Maternal inheritance of human mitochondrial DNA [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 1980, 77: 6715-6719.
- [4] INGMAN M, KAESSMANN H, PAABO S, et al. Mitochondrial genome variation and the origin of modern humans [J]. *Nature*, 2000, 408: 708-713.
- [5] BROWN W M, GEORGE J R M, WILSON A C. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 1979, 76: 1967-1971.
- [6] CAVALLI SFORZA L L, FELDMAN M W. The application of molecular genetic approaches to the study of human evolution [J]. *Nature Genetics*, 2003, 33: 266-275.
- [7] CANN R L, STONEKING M, WILSON A C. Mitochondrial DNA and human evolution [J]. *Nature*, 1987, 325: 31-35.
- [8] KRINGS M, GEISERT H, SCHMITZ R W, et al. DNA sequence of the mitochondrial hypervariable region from the Neanderthal type specimen [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 1999, 96: 5581-5585.
- [9] KRINGS M, STONE A, SCHMITZ R W, et al. Neanderthal DNA sequence and the origin of modern humans [J]. *Cell*, 1997, 90: 19-30.
- [10] KRINGS J, DEAR P H, POLLACK J L, et al. Multiplex amplification of the mammoth mitochondrial genome and the evolution of Elephantidae [J]. *Nature*, 2005, 439(7077): 724-727.
- [11] 张亚平, 范志勇. 大熊猫 DNA 序列变异及其遗传多样性研究 [J]. *中国科学: C 辑: 生命科学*, 1997, 27(2): 139-144.
- [12] LECIS R, NORRISK. Population genetic diversity of the endemic Sardinian newt *Euproctus platycephalus*: implications for conservation [J]. *Biological Conservation*, 2004, 119: 263-270.
- [13] AVISE J C, VRUENHOEK R C. Mode of inheritance and variation of mitochondrial DNA in hybridogenetic fishes of genus *Pociliopsis* [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 1987, 4: 514-525.
- [14] AVISE J C, ARNOLD J, BALL R M. Intraspecific phylogeography population: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics [J]. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 1989, 18: 489-522.
- [15] SHAPIRO B, DRUMMOND A J, RAMBAUT A, et al. Rise and fall of Beringian steppe bison [J]. *Science*, 2004, 306: 1561-1565.
- [16] GUO S C, SAVOLAINEN P, SU J P, et al. Origin of mitochondrial DNA diversity of domestic yaks [EB/OL]. 2006-10-06 [2007-01-07]. *BMC Evolutionary Biology*. <http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1471-2148-6-73.pdf>.
- [17] VILA C, SEDDON J, ELLEGREN H. Genes of domestic mammals augmented by backcrossing with wild ancestors [J]. *Trends in Genetics*, 2005, 21: 214-218.
- [18] DIAMOND J. Evolution, consequences and future of plant and animal domestication [J]. *Nature*, 2002, 418: 700-707.
- [19] MACHUGH D E, BRADLEY D G. Livestock genetic origins: goats buck the trend [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 2001, 98: 5382-5384.
- [20] TROY C S, MACHUGH D E, BAILEY J F, et al. Genetic evidence for Near-Eastern origins of European cattle [J]. *Nature*, 2001, 410: 1088-1091.
- [21] LOFTUS R T, ERTUGRUL O, HARBA A H, et al. A microsatellite survey of cattle from a centre of origin: the Near East [J]. *Molecular Ecology*, 1999, 8: 2015-2022.
- [22] SAVOLAINEN P, ZHANG Y P, LUO J, et al. Genetic evidence for an East Asian origin of domestic dogs [J]. *Science*, 2002, 298: 1610-1613.
- [23] LARWON G, DOBNEY K, ALBARELLA U, et al. Worldwide phylogeography of wild boar reveals multiple centers of pig domestication [J]. *Science*, 2005, 307: 1618-1621.
- [24] LIU Y P, WU G S, YAO Y G, et al. Multiple maternal origins of chickens: Out of the Asian jungles [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2006, 38: 12-19.
- [25] VILA C, LEONARD J A, GOTHERSTROM A, et al. Widespread origins of domestic horse lineages [J]. *Science*, 2001, 291: 474-477.
- [26] BEJA- PEREIRA A, ENGLAND P R, FERRAND N, et al. African origins of the domestic donkey [J]. *Science*, 2004, 304: 1781.
- [27] 王江. 原羚属及羚羊亚科属间系统发育关系研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2004.
- [28] XU X F, JANKE A, ARNASON U. The complete mitochondrial DNA sequence of the Great Indian Rhinoceros, *Rhinoceros unicornis*, and the phylogenetic relationship among Carnivora, *Perissodactyla*, and *Artiodactyla* (+*Cetacea*) [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 1996, 13(9): 1167-1173.
- [29] HUGHES J M, BAKER A J. Phylogenetic relationships of the Enigmatic *Hoatzin* (*Opisthocomus hoazin*) resolved using mitochondrial and nuclear gene sequences [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 1999, 16(9): 1300-1307.
- [30] KIRCHMAN J J, WHITTINGHAM L A, SHELDON F H. Relationships among cave swallow populations (*Petrochelidon fulva*) determined by comparisons of microsatellite and cytochrome b data [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2000, 14(1): 107-121.
- [31] KIRCHMAN A, BRANDLEY M C, MAUSFELD P, et al. Opening the black box: phylogenetics and morphological evolution of the Malagasy fossorial lizards of the subfamily "Scincinae" [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2005, 34: 118-133.
- [32] DALEN L, FUGLEI E, HERSTEINSSON P, et al. Population history and genetic structure of a circumpolar species: the arctic fox [J]. *Biological Journal of the Linnean Society*, 2005, 84: 79-89.
- [33] ALVES M J, COELHO H, COLLARES - PEREIRA M J, et al. Mitochondrial DNA variation in the highly endangered cyprinid fish *Anaocypris hispanica*: importance for conservation [J]. *Heredity*, 2001, 87(4): 463-73.
- [34] BALAKRISHNAN C N, MONFORT S L, GAUR A, et al. Phylogeography and conservation genetics of Eld's deer (*Cervus eldi*) [J]. *Molecular Ecology*, 2003, 12(1): 1-10.
- [35] 宿兵, KRESSIRER P, MONDA K, 等. 中国黑冠长臂猿的遗传多样性及其分子系统学研究——非损伤性取样 DNA 序列分析 [J]. *中国科学: C 辑*, 1996, 26(5): 414-419.
- [36] 于宁. 中国鼠兔分子系统及进化研究 [D]. 西宁: 中国科学院西北高原生物所, 1997.
- [37] 王加连, 杨光, 刘海, 等. 线粒体 DNA 序列分析在中国水域真海豚物种鉴定中的初步应用 [J]. *兽类学报*, 2003, 23(2): 120-126.
- [38] HE D K, CHEN Y F, CHEN Y Y, et al. 2004. Molecular phylogeny of the specialized schizothoracine fishes (Teleostei: Cyprinidae), with their implications for the uplift of the Qinghai-Tibetan Plateau [J]. *Chinese Science Bulletin* 49: 39-48.
- [39] XIAO H, CHEN S Y, LIN Z M, et al. 2005. Molecular phylogeny of *Snocydocheilus* (Cypriniformes: Cyprinidae) inferred from mitochondrial DNA sequences [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 36: 67-77.
- [40] ZHAO K, LI J B, YANG G S, et al. Molecular phylogenetics of *Gymnocypris* (Teleostei: Cyprinidae) in Lake Qinghai and adjacent drainages [J]. *Chinese Science Bulletin*, 2005, 50: 1325-1333.