

大鸨 (*Otis tarda*) 两个亚种的遗传多样性与系统分化

刘 铸^{1,2}, 田秀华^{1,*}, 白素英^{1,3}

(1. 东北林业大学野生动物资源学院, 哈尔滨 150040 2. 牡丹江师范学院生物系, 牡丹江 157012 ;

3. 国家林业局野生动植物检测中心, 哈尔滨 150040)

摘要 大鸨 (*Otis tarda*) 为中国 I 级重点保护动物, 分为两个亚种, 即指名亚种 (*Otis tarda tarda*) 和东方亚种 (*Otis tarda dybowskii*)。研究从代表母系遗传特征的 mtDNA 控制区和代表双亲遗传特征的核微卫星两方面对两个亚种的遗传多样性与系统分化进行了分析。指名亚种 mtDNA 控制区 3 段序列 (CtIaL/CtIIoH、L438/H772 和 LCR2a/HCR8) 的单倍型数、 π 、 δ 和 K 都明显高于东方亚种, 更显著高于松辽平原西北部繁殖区。东方亚种 3 个微卫星 (Otmic08、Otmic16 和 Otmic26) 的等位基因数、 H_o 和 H_e 明显低于指名亚种。因此东方亚种的遗传多样性都明显低于指名亚种, 甚至低于 Madrid 种群。两个亚种存在于不同的系统分支, 证实了两个亚种的系统关系。欧洲指名亚种存在更多的系统分支。

关键词 大鸨东方亚种; 大鸨指名亚种; 遗传多样性; 系统分化

文章编号: 1000-0933 (2007) 06-2435-08 中图分类号: Q16, Q955, Q958.1, Q959.7 文献标识码: A

The genetic diversity and phylogenetic differentiation analysis on two subspecies of *Otis tarda*

LIU Zhu^{1,2}, TIAN Xiu-Hua^{1,*}, BAI Su-Ying^{1,3}

1 College of Wild life Resources, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

2 Department of Biology, Mudanjiang Teachers' College, Mudanjiang 157012, China

3 Detecting Center of Wild Fauna and Flora, The State Forestry Administration, Harbin 150040, China

Acta Ecologica Sinica 2007, 27 (6): 2435 ~ 2442.

Abstract : *Otis tarda* is listed as a first-rating protected bird in China, which has two subspecies, *O. t. tarda* and *O. t. dybowskii*. The genetic diversity and phylogenetic differences between the two *Otis tarda* subspecies were analyzed by the mtDNA control region method that on behalf of the maternal genetic character and the microsatellite method that on behalf of parental genetic character. The number of haplotype, π , δ and K of *O. t. tarda* are higher than those of *O. t. dybowskii* among three sequences of mtDNA control region (CtIaL/CtIIoH, L438/H772 and LCR2a/HCR8), and significantly higher than the population in the northwest of Songliao Plain. The numbers of alleles, H_o and H_e of *O. t. dybowskii* are lower than those of *O. t. tarda* among three microsatellites (Otmic08, Otmic16 and Otmic26). Therefore, the genetic diversity of *O. t. dybowskii* is obviously lower than that of *O. t. tarda*. The two subspecies are located at two phylogenetic branches, which confirmed that the phylogenetic relationship between two subspecies. Moreover, *O. t. tarda* has much more phylogenetic branches than *O. t. dybowskii*.

基金项目: 黑龙江省科技攻关资助项目 (GC04B519)

收稿日期: 2006-12-22; 修订日期: 2007-01-11

作者简介: 刘铸 (1979 ~), 男, 黑龙江人, 硕士, 从事动物保护及分子生物学研究. E-mail: liuzhu590@sohu.com

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: tianxiu-hua@163.com

Foundation item : The project was financially supported by the Heilongjiang Provincial Scientific and Technical Program of Tackling Key Problem (No. GC04B519)

Received date 2006-12-22 ; **Accepted date** 2007-01-11

Biography LIU Zhu, Master, mainly engaged in animal protecting and molecule biology. E-mail: liuzhu590@sohu.com

Key Words : *Otis tarda dybowskii* ; *Otis tarda tarda* ; genetic diversity ; phylogenetic differentiation

大鸨为中国 I 级重点保护动物, IUCN 将其定为易危物种, 中国鸟类红皮书将其定为全球受胁物种。1997 年被列 CITES 附录 II。大鸨是草原生态指示物种^[1], 分为两个亚种, 即指名亚种 (*O. t. tarda*) 和东方亚种 (*O. t. dybowskii*)。俄罗斯的图瓦、蒙古西部、新疆东部似乎是两个亚种的分界线。2000 年报道全世界大鸨数量约 31000 ~ 37000 只^[2], 分布于亚欧大陆和非洲北部。目前, 除伊比利亚半岛种群数量保持稳定外, 其它地区的大鸨数量都在减少^[3~5]。我国东方亚种尤为严重, 其分布范围正在紧缩, 栖息地严重破碎化。

物种的遗传多样性与系统分化是保护生物学研究的重要方面。欧洲学者已经对指名亚种的遗传学工作进行了部分研究^[6~8]。目前, 东方亚种分布区的国家对其研究较少, 不能够对两个亚种的遗传多样性及系统分化进行整体分析, 限制了两个亚种科学保护工作的展开。因此, 本研究通过实验对我国东方亚种遗传特征进行分析, 用已有序列和资料对指名亚种遗传特征进行分析, 并对两亚种进行比较。其研究结果将有利于这一受胁物种的保护。

mtDNA 的控制区进化速度很快, 比 mtDNA 其它基因快 3 ~ 5 倍, 比一般的核基因快 10 ~ 20 倍, 具有高效的单倍体母系遗传方式^[9, 10], 可缩减用于检测的有效种群的大小, 并且满足非损伤性取样的要求, 受到国内外的青睐^[11]。微卫星 DNA 标记具有分布广泛、多态性丰富、易于检测、显性遗传、进化所受选择压力小等特点, 被认为是各类遗传标记中最有价值的一种^[12, 13]。mtDNA 代表母系遗传家系的遗传特征, 微卫星代表双亲遗传特征。所以, 本研究能从双亲与母系两方面全面、科学的分析其遗传现状。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样本

对 47 只大鸨东方亚种进行取样: 哈尔滨动物园 4 只, 长春动物园 6 只, 吉林白城 12 只, 内蒙古图牧吉 13 只, 山东东营 3 只, 陕西西安 4 只, 天津 2 只, 甘肃 2 只, 无锡动物园 1 只, 这些地域包括了我国东方亚种的 2 个繁殖区 (松辽平原西北部繁殖区和乌兰察布高原繁殖区) 和 3 个越冬区 (黄河中下游越冬区、长江中下游越冬区和东北松嫩平原西北部越冬区); 对 1 只新疆阿勒泰指名亚种样本 (8A) 进行取样。哈尔滨动物园和长春动物园共 10 只, 都来源于吉林白城, 其它都产于当地。这些大鸨都捕捉自野外并非人工繁殖个体, 而且为随机取样, 可以视为无关个体。取样采取非伤害性取样: 取 70 μ l EDTA 抗凝全血和拔取羽毛; 非损伤性取样: 收集脱落的羽毛^[11]。

1.1.2 引物

本研究对 mtDNA 控制区 I 和 II 约 800 bp 序列进行研究, 由于片段过长, 特别对于羽毛样本来说, 很难获得 PCR 产物, 因此合成了 3 对引物: Ctrl₁L (5'-ATATCGTGCATACATTTATATTCCC-3')/Ctrl₁H (5'-AAAGAATGGGCCTGAAGCTAG-3')^[1]、L438 (5'-TCACGTGAAATCAGCAACCC-3')/H772 (5'-AAACACTTGAAACCGTCTCAT-3')^[4] 和 LCR2a (5'-ACTAGCTTCAGGCCATTCTTTCC-3')/HCR8 (5'-gagaatttgtagaaa acgcctagt-3')^[7]。3 对引物在控制区具体位置见图 1。本研究选用 3 对曾经用于指名亚种的微卫星引物 Otmic08 (F: 5'-GAATTTGACTAATCTCAGATGG-3'/R: 5'-AACCTTAAACTTAATCACATTCCG-3'), Otmic16 (F: 5'-GAGAGACTGGAATAAATGTC-3'/R: 5'-GTATACTGTATAACACTAAGC-3'), Otmic26 (F: 5'-CAGGAAACACTTACAAGAGG-3'/R: 5'-CTGGCAGTTCTAGATTCCG-3')^[15], 引物由上海生工生物工程服务技术有限公司 (Sangon) 合成。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取

血液和羽毛样本用酚-氯仿法对样本基因组 DNA 进行提取。提取产物的含量和纯度均在蛋白质核酸分析仪 DU640 (Beckman 公司) 上进行检测。样品用 TE 调整 DNA 终浓度至 50 ng/ μ l, 保存于 4 $^{\circ}$ C 备用。

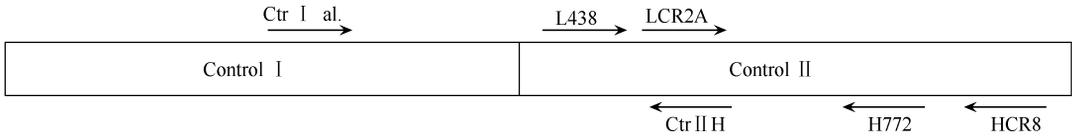


图1 mtDNA 控制区 3 对引物的分布

Fig. 1 Ranging of 3 pairs of primer on mtDNA control region

1.2.2 PCR 扩增

mtDNA 控制区反应体系为 50 μ l, 含 200 μ mol/L 的 dNTP, 1.5 mmol/L 的 $MgCl_2$, Primer 各 10 pmol, *Taq* DNA polymerase 2.5 U (大连宝生物), 模板为 250 ng。扩增程序为 94 $^{\circ}C$ /3 min, (94 $^{\circ}C$ /30s, 54 $^{\circ}C$ /30s, 72 $^{\circ}C$ /45s)^{30cycles}, 72 $^{\circ}C$ /7min, 4 $^{\circ}C$ / ∞ 。微卫星反应体系 10 μ l, 含 200 μ mol/L 的 dNTP, 1.5 mmol/L 的 $MgCl_2$, Primer 各 2 pmol, *Taq* DNA polymerase 0.5 U, 模板为 50 ng。微卫星扩增程序为 94 $^{\circ}C$ /3 min, (94 $^{\circ}C$ /15 s, 57 $^{\circ}C$ /20 s, 72 $^{\circ}C$ /30 s)^{14cycles}, (94 $^{\circ}C$ /15 s, 54 $^{\circ}C$ /20 s, 72 $^{\circ}C$ /30 s)^{28cycles}, 72 $^{\circ}C$ /30 min, 4 $^{\circ}C$ / ∞ 。

1.2.3 电泳及测序

PCR 扩增产物经 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测。纯化回收 mtDNA 控制区扩增产物, 进行测序。微卫星扩增产物利用 12% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 银染法检测。用数码相机拍照并分型、判定片断大小。

1.3 统计分析

对于 mtDNA 的控制区 3 段序列来说, 分别通过 GenBank 下载相应指名亚种序列。序列使用 EditSeq (DNASTAR 软件包) 进行序列编辑, 再利用 Clustal W 软件进行序列聚类比对。用 DnaSP 4.10 软件包区分单倍型和计算所获序列的核苷酸多态性 (Nucleotide diversity, π)、单倍型多态性 (Haplotype diversity, δ) 及核苷酸差异均数 (Average number of differences, K)。利用 MEGA 3.0 计算基础数据, 及用 NJ 方法构建带有 bootstrap 检测值的系统树。对于微卫星来说, 运用群体遗传学分析软件 GENEPOP (version 3.4) (<http://wbiomed.curtin.edu.au>) 对基础数据进行统计分析^[6]。

运用中国农科院家禽研究所编制的聚类分析软件 (version 1.2) 对杂合度 (heterozygosity, h) 进行了统计。

根据公式进行 Hardy-Weinberg 平衡检验, 其公式为:

$$X^2 = \sum [(O - E)^2 / E]$$

式中, O 为基因型数观察值, E 基因型数期望值。

2 结果

2.1 mtDNA 控制区实验结果

2.1.1 CtrIaL/CtrIIoH 间的序列分析结果

通过测序获得了 28 只大鸨东方亚种个体和 1 只指名亚种个体的 341 bp 的 mtDNA 控制区序列。28 只大鸨东方亚种的 4 种碱基的平均含量 (%), 突变类型及比例、 π 、 δ 和 K 见表 1, 具有 8 个单倍型, 见表 2。其中包括 22 个松辽平原西北部繁殖区个体。这个种群的 4 种碱基的平均含量 (%), 突变类型及比例、 π 、 δ 和 K 见表 1, 具有 6 个单倍型。

从 GenBank 中下载 AF421964-AF422107^[1], 获得了分布于西班牙中部的指名亚种 Madrid 种群的 144 个个体的相应序列。这个种群的 4 种碱基的平均含量 (%), 突变类型及比例、 π 、 δ 和 K 见表 1, 具有 10 个单倍型, 见表 2。对东方亚种 8 个单倍型和我国指名亚种 (8A) 单倍型以及 Madrid 省种群的 10 个单倍型构建 NJ 树 (模型: Kimura 2-parameter), 见图 2。

2.1.2 L438/H772 间的序列分析结果

通过测序获得了 11 只东方亚种和 1 只指名亚种个体 309 bp 的 mtDNA 控制区序列。4 种碱基的平均含量 (%) 见表 1。引物 L438/H772 的扩增片段相对保守, 因此在 12 只大鸨中并没有发现突变位点。孔有琴对此序列研究时, 发现 3 个稀有单倍型^[8]。

从 GenBank 中下载 AF046879-AF046883 ,再结合文献^[7] ,共获得了 66 个个体的相应序列 ,来自于代表欧洲指名亚种现状的 6 个重要种群 ,包括 :西班牙的 Madrid 和 Cáceres、德国的 Rathenow、匈牙利的 Dévaványa、斯洛伐克的 Nitra 和俄罗斯 Saratov。4 种碱基的平均含量 (%)、突变类型及比例、 π 、 δ 和 K 见表 1 ,具有 5 个单倍型 ,见表 3。对于这 5 个单倍型、本实验获得的 1 个单倍型以及孔有琴获得的 3 个稀有单倍型建 NJ 树 (模型 :Kimura 2-parameter) ,见图 3。

表 1 两个亚种的 4 种碱基的平均含量 (%)、突变类型及比例、 π 、 δ 和 K

Table 1 Percentage (%) , mutation type and ratio , π , δ and K of four base of two subspecies

| | 东方亚种 <i>O. t. dybowskii</i> | | | | 指名亚种 <i>O. t. tarda</i> | | |
|-------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------|------------|-------------------------|-----------|------------|
| | CtrlLaL/CtrlIoH | | L438/H772 | LCR2a/HCR8 | CtrlLaL/CtrlIoH | L438/H772 | LCR2a/HCR8 |
| | 东方亚种 | 松辽种群 Songliao population | | | | | |
| A | 28.5 | 28.5 | 18.4 | 21.4 | 29.4 | 18.2 | 21.1 |
| T | 26.8 | 26.8 | 33.7 | 35.3 | 26.4 | 33.7 | 35.5 |
| C | 26.1 | 26.1 | 31.4 | 25.3 | 26.1 | 31.5 | 25.3 |
| G | 18.6 | 18.6 | 16.5 | 18.0 | 18.1 | 16.6 | 18.0 |
| 转换 r | 6 | 5 | 0 | 0 | 8 | 3 | 4 |
| 颠换 v | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 插入和缺失 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 转换颠换比 $r:v$ | 6:1 | 5:1 | 0 | 0 | 8:1 | 3:1 | 4:0 |
| π | 0.00328 | 0.00288 | - | - | 0.00544 | 0.00371 | 0.00308 |
| δ | 0.589 | 0.589 | - | - | 0.650 | 0.641 | 0.596 |
| K | 0.978 | 0.978 | - | - | 1.849 | 1.147 | 1.314 |

表 2 大鸨东方亚种和指名亚种 Madrid 种群 CtrlLaL/CtrlIoH 间序列的单倍型

Table 2 Haplotype of sequence between CtrlLaL/CtrlIoH for *O. t. dybowskii* and *O. t. tarda* population in Madrid

| 单倍型 Haplotype | 东方亚种位点 <i>O. t. dybowskii</i> Locus | | | | | | | 指名亚种 Madrid 种群位点 <i>O. t. tarda</i> population in Madrid Locus | | | | | | | | |
|------------------|-------------------------------------|----|----|----|-----|-----|-----|----------------------------------------------------------------|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 39 | 65 | 70 | 75 | 131 | 136 | 204 | 23 | 48 | 71 | 126 | 127 | 161 | 236 | 237 | 289 |
| A | G | C | T | C | A | T | G | C | T | C | C | C | C | T | C | A |
| B | G | C | T | C | G | T | G | A | C | C | T | C | T | T | C | A |
| C | T | C | T | C | G | T | G | C | C | C | T | C | T | T | C | A |
| D | G | C | T | T | G | C | G | C | C | T | C | C | T | C | T | A |
| E | G | T | T | C | A | C | G | C | C | C | C | C | C | C | T | A |
| F | G | T | T | C | A | T | G | C | C | C | C | T | C | C | T | A |
| G | G | T | T | C | G | T | A | C | C | C | C | C | T | C | C | A |
| H | G | T | C | C | G | T | G | C | C | C | C | C | T | C | C | G |
| I | | | | | | | | C | C | C | C | C | C | C | T | G |
| J | | | | | | | | C | C | C | C | C | T | C | T | G |

表 3 指名亚种分布于欧洲的 6 种群 L438/H772 间序列的单倍型

Table 3 Haplotype of sequence between L438/H772 for *O. t. tarda* 6 populations in Europe

| 单倍型 Haplotype | 位点 Locus | | | | 分布 Range | | | | | |
|------------------|----------|-----|-----|----|----------|---------|----------|-----------|-------|---------|
| | 151 | 184 | 287 | | Madrid | Cáceres | Rathenow | Dévaványa | Nitra | Saratov |
| A | T | G | A | T | - | - | - | - | 2 | 1 |
| B | C | G | G | T | 4 | 2 | - | 2 | - | 1 |
| C | T | A | A | T | 16 | 3 | - | - | - | - |
| D | C | G | A | T | 5 | 4 | 11 | 5 | 4 | 5 |
| E | T | G | A | G | - | - | - | - | - | 1 |
| 合计 Total | 66 | 25 | 9 | 11 | 7 | 6 | 8 | | | |

2.1.3 LCR2a/HCR8 的间的序列分析结果

通过测序获得了 15 只东方亚种和 1 只指名亚种个体 428 bp 的 mtDNA 控制区序列。4 种碱基的平均含量 (%)、突变类型及比例见表 1。扩增片段约前 300 bp 与引物 L438/H772 的扩增片段重合,没有发现突变位点,后 100 bp 存在一个变异位点,为插入变异,表现为 2 个单倍型。

从 Genbank 中下载了 AY102722-AY102727,再结合文献 [6],共获得了 54 个个体的相应序列,来自于指名亚种在西班牙西部 (C'aceres)、南部 (Andalucia) 分布的 2 个重要种群和在非洲北部摩洛哥的种群,分析表明 4 种碱基的平均含量 (%)、突变类型及比例、 π 、 δ 和 K 见表 1,具有 7 个单倍型,见表 4。

2.2 微卫星实验结果

通过实验获得了东方亚种的等位基因数、观察杂合度 (H_o) 和期望杂合度 (H_e)。通过文献获得了指名亚种的等位基因数、 H_o 和 H_e ,对两个亚种进行了比较,见表 5。3 个位点中,Otmic26 表现为单态,对其它两个位点进行了 Hardy-Weinberg 平衡检验。Otmic08 的 X^2 值为 20.61, $X^2 > X^2_{0.05}$ ($df = 1$)。Otmic16 的 X^2 值为 105.38, $X^2 > X^2_{0.05}$ ($df = 28$),说明这两个位点都偏离了 Hardy-Weinberg 平衡。

3 讨论

3.1 mtDNA 控制区 3 段序列的多态性比较

研究发现 3 段序列 (CtrlLa/CtrlIoH、L438/H772 和 LCR2a/HCR8) 的多态性不同。单倍型数量分别为 8、1

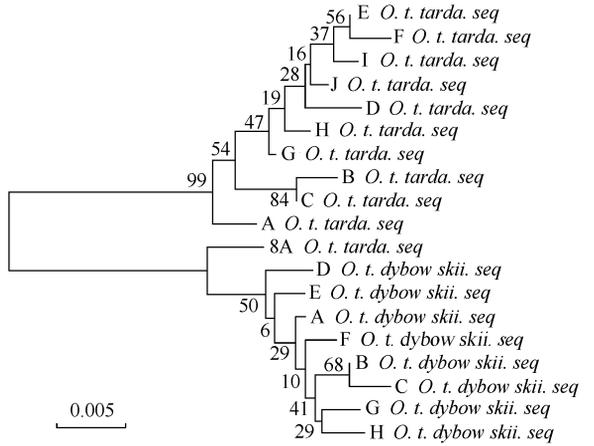


图 2 大鸨指名亚种 Madrid 种群与东方亚种的 NJ 树 (基于 CtrlLa/CtrlIoH 序列)

Fig. 2 NJ tree of *O. t. tarda* in Madrid and *O. t. dybowskii* in China (based on sequence between CtrlLa/CtrlIoH)

A - H *O. t. dybowskii* 表示东方亚种的 8 个单倍型, A - J *O. t. tarda* 表示指名亚种的 10 个单倍型, 8A *O. t. tarda* 表示我国指名亚种单倍型, A - H *O. t. dybowskii* show 8 haplotypes in *O. t. dybowskii*, A - J *O. t. tarda* show 10 haplotypes in *O. t. tarda*, 8A *O. t. tarda* show the haplotype of *O. t. tarda* in China

表 4 指名亚种分布于 Andalucia、Cáceres 和摩洛哥的 3 种群 LCR2a/HCR8 间序列的单倍型

Table 4 Haplotype of sequence between LCR2a/HCR8 for *O. t. tarda* 3 populations in Andalucia, Cáceres and Morocco

| 单倍型 Haplotype | | | | | 分布 Range | | |
|---------------|-----|-----|-----|----|-----------|---------|---------|
| 位点 Locus | 184 | 287 | 151 | 89 | Andalucia | Cáceres | Morocco |
| A | C | A | C | | 3 | 5 | 25 |
| B | C | A | T | | | 1 | |
| C | T | A | T | | 2 | 1 | |
| D | C | G | C | | 3 | 2 | |
| E | C | G | T | | | 1 | |
| F | T | A | T | | 4 | 5 | |
| G | T | A | C | | | 2 | |
| 合计 Total | 54 | 12 | 25 | | | | |

表 5 3 个微卫星位点在大鸨东方亚种和指名亚种中的等位基因、 H_o 和 H_e

Table 5 No. of alleles, H_o and H_e of 3 microsatellite loci in *Otis tarda dybowskii* and *Otis tarda tarda*

| 位点 Locus | 东方亚种 (<i>O. t. dybowskii</i>) | | | | 指名亚种 (<i>O. t. tarda</i>) | | |
|------------|---------------------------------|-------|-------|----------------------|-----------------------------|-------|--|
| | 等位基因数 No. of alleles | H_o | H_e | 等位基因数 No. of alleles | H_o | H_e | |
| Otmic16 | 8 | 1.000 | 0.832 | 15 | 0.918 | 0.907 | |
| Otmic08 | 2 | 0.065 | 0.177 | 4 | 0.271 | 0.581 | |
| Otmic26 | 2 | 0 | 0 | 4 | 0.146 | 0.137 | |
| 平均 Average | 4 | 0.355 | 0.336 | 7.667 | 0.445 | 0.542 | |

和 2 个单倍型。由此显示 :引物 CtrIaL/CtrIloH 间序列变异最多 ,进化速度最快 ,具有最高多态性 ;LCR2a/HCR8 间序列的多态性次之 ;L438/H772 间序列变异最少 ,最为保守。Idaghdour 等 2004 年对北非波斑鸨遗传结构进行研究时发现 3 段序列的变异位点分别为 21、5 和 13 个 [17]。由此可见 ,尽管 mtDNA 控制区的进化速度较快 ,但其不同部位进化速度并不相同。因此 ,今后可以根据研究对象的不同来选择不同的序列作为标记 ,对于遗传多样性较低的群体可以选择引物 CtrIaL/CtrIloH 和 LCR2a/HCR8 间序列作为标记。对于遗传多样性较丰富的群体或者种间遗传研究可以选择引物 L438/H772 间序列作为遗传标记。

3.2 大鸨东方亚种多态性

本研究对东方亚种和亚种内松辽平原西北部繁殖区大鸨 mtDNA 控制区的 3 段序列多态性进行了评估 ,即使对于 CtrIaL/CtrIloH 扩增序列 ,这个多态性最高的序列来说 ,从代表遗传多样性的参数可以看出东方亚种遗传多样性较低。松辽平原西北部繁殖区是我国东方亚种最重要的种群 ,因此对其进行了大量取样且单独分析。分析表明 ,松辽平原西北部繁殖区种群占据了我国东方亚种遗传多样性的绝大部分。引物 CtrIaL/CtrIloH 扩增序列对于我国东方亚种来说 ,共有 7 个突变位点 8 个单倍型 ,松辽平原西北部繁殖区种群占据 6 个突变和 6 个单倍型 ,尽管 π 、 δ 和 K 的值都略低于我国东方亚种 ,但是松辽平原西北部繁殖区种群的遗传多样性对于我国东方亚种遗传多样性占有举足轻重的地位。

由于只用一种代表母系遗传特征的标记对东方亚种遗传多样性进行评价缺乏全面性和科学性 ,因此 ,本研究还利用代表双亲遗传特征的微卫星标记进行分析。从表 6 可以看出 ,微卫星的研究结果同样表明东方亚种遗传多样性很低 ,并且偏离了 Hardy-Weinberg 平衡。

3.3 大鸨东方亚种与指名亚种遗传多样性比较

大鸨指名亚种与东方亚种相比具有数量大、分布范围广的特点 ,因此 ,欧洲科学家研究指名亚种时 ,取样数量一般都很大 ,而本研究的取样数量绝对值较小 ,但其相对比值却高于指名亚种。

从 CtrIaL/CtrIloH 间序列来看 ,分布于西班牙中部的 Madrid 种群的 π 、 δ 、 K 三个多样性参数略高与我国东方亚种多样性参数 ,明显高于松辽平原西北部繁殖区种群。Madrid 省的种群具有 10 个单倍型 ,我国东方亚种具有 8 个单倍型 ,松辽平原西北部繁殖区种群具有 6 个单倍型。

从 L438/H772 间序列来看 ,分布于欧洲代表指名亚种遗传多样性现状的 6 个重要种群共获得了 5 个单倍型 ,而我国东方亚种只获得了 1 个单倍型 2003 年孔有琴对其进行研究时还获得了 3 个稀有单倍型 [18] ,比较而言 ,指名亚种多样性还是明显高于东方亚种。

从 LCR2a/HCR8 间序列来看 ,分布于西班牙西部 (C'aceres)、南部 (Andalucia)的指名亚种的 2 个重要种群和非洲北部摩洛哥的 1 个种群 ,共获得了 7 个单倍型。因为欧洲指名亚种被分为欧洲大陆和伊比利亚半岛两大群体 ,因此 ,这 3 个种群可以代表伊比利亚半岛大群体的遗传多样性现状。而我国东方亚种只具有 2 个单倍型。再一次证明指名亚种多样性明显高于东方亚种。

3.4 mtDNA 控制区建立的系统关系

由 CtrIaL/CtrIloH 间序列构建的系统发生树来看 ,在东方亚种分支中 ,松辽平原西北部繁殖区占据了东方亚种 8 个单倍型中的 6 个 ,乌兰察布高原繁殖区共有 2 个单倍型 ,其中 1 个单倍型与松辽平原西北部繁殖区的 1 个单倍型所共有 ,还有 1 个独有的单倍型 ,黄河中下游越冬区共有 3 个单倍型 ,其中 1 个与松辽平原西北

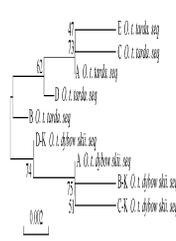


图 3 大鸨指名亚种分布于欧洲的 6 种群与大鸨东方亚种中的 NJ 树 (基于 L438/H772 间序列)

Fig.3 NJ tree of *O. t. tarda* 6 population in Europe and *O. t. dybowskii* (based on sequence between L438/H772)

A *O. t. dybowskii* 表示此研究获得的东方亚种的单倍型 ,BK-DK *O. t. dybowskii* 表示孔有琴获得的东方亚种 3 个单倍型 ,A-E *O. t. tarda* 表示欧洲指名亚种 5 个单倍型 A *O. t. dybowskii* show the haplotype of *O. t. dybowskii* in our study ,BK-DK *O. t. dybowskii* show 3 haplotypes of *O. t. dybowskii* in Kongyouqin ' study ,A-E *O. t. tarda* show the haplotype of *O. t. tarda* in Europe

部繁殖区共有 1 个与两个繁殖区共有 除此之外 还有一个独有的单倍型。长江中下游越冬区取样较少 只有 1 个样本 与两个繁殖区单倍型共有 (图 2 和图 4)。

可见 松辽平原西北部繁殖区是我国东方亚种重要繁殖区 相比之下 乌兰察布高原繁殖区多样性较小 与松辽平原西北部繁殖区存在基因流 并且存在独有的单倍型。大鸨为半迁移鸟类 越冬季节部分长距离迁移南方 还有一部分只进行短距离迁移或不进行迁移。从松辽平原西北部繁殖区到东北松嫩平原西北部越冬区越冬就属于进行短距离迁移或不进行迁移的群体 无疑其间必然存在遗传关系 松辽平原西北部繁殖区和乌兰察布高原繁殖区部分种群迁移到黄河中下游越冬区越冬 由于黄河中下游越冬区存在独有的单元型 推测还有其它繁殖区种群到黄河中下游越冬区越冬 松辽平原西北部繁殖区和乌兰察布高原繁殖区部分种群可能迁移到长江中下游越冬区越冬。

图 2 显示 大鸨的系统树分为明显的 2 支 欧洲指名亚种为一支 分布于中国的东方亚种先聚在一起 再与分布于新疆阿尔泰的指名亚种聚为另一支。该系统发生树表明 我国的大鸨东方亚种与欧洲的指名亚种为 2 个单系群的分支 证实了两个亚种现有的系统关系和分类地位。但新疆阿尔泰的指名亚种个体 (8A) 却并未与欧洲指名亚种聚为一支 而是与我国东方亚种有较近的系统关系。由于该种群只有 1 份样品 无法确切说明该独特的单倍型是否代表了其特殊的系统地位。有待扩大样品量 进一步分析。指名亚种的 Madrid 种群在微地理尺度上都存在很多系统分支 可见 较东方亚种有较好的多样性。由图 3 可知 代表目前欧洲指名亚种的 6 个繁殖区系统分化与东方亚种存在不同分支 且具有更多的分支 可见我国东方亚种的濒危。

综上所述 两个亚种不但在数量和分布上存在明显差异 而且其遗传特征更存在明显不同 从各项数据可以看出大鸨指名亚种遗传多样性明显高于东方亚种 并且从系统发生学角度来看 指名亚种具有更多的遗传分支。然而 欧洲学者认为目前指名亚种的遗传多样性很低 并且种群具有高度脆弱性 比较而言 我国的东方亚种就更加濒危了。通过本研究可以看出 大鸨遗传多样性低和亚种下分化水平低是共性问题 我国东方亚种尤为显著。因此 为了保护这种珍稀濒危鸟类 急需进行进一步研究 结合各国实际情况 制定出科学、有效的保护措施。

References :

[1] Martin C A , Alonso J C , Alonso J. Great bustard population structure in central Spain : concordant results from genetic analysis an dispersal study Proc Biol Sci , 2002 , 269 (1487) : 119 - 125.

[2] Alonso J C , Palacin C , Martin C A. Status and recent trends of the great bustard (*Otis tarda*) population in the Iberian Peninsula Biological Conservation , 2003 , 110 : 185 - 195.

[3] Kollar H P. Action Plan for the Great Bustard (*Otis Tarda*) in Europe BirdLife International , 1996.

[4] Marcia P , Pedro R , Francisco M. Long-term trends in great bustard (*Otis tarda*) populations in Portugal suggest concentration in single high quality area Biological Conservation , 2005 , 124 : 415 - 423.

[5] Tian X H , Wang J J. great bustard in China. Harbin : Northeast Forestry University Publishing House , 2001.

[6] Broderick D , Idaghdour Y , Korrida A , Gene flow in great bustard populations across the Strait of Gibraltar as elucidated from excremental PCR and mtDNA sequencing Conservation Genetics , 2003 , 4 (6) : 793 - 800.

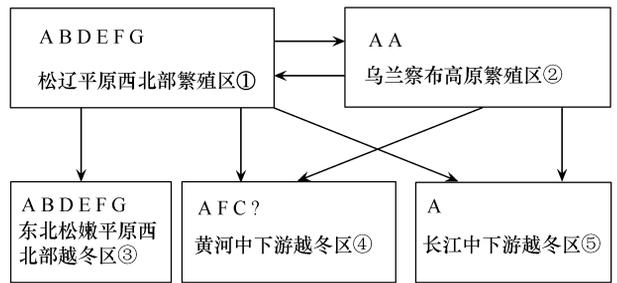


图 4 mtDNA 控制区的遗传结构图

Fig. 4 Picture of genetic structure of mtDNA control region

A - H 表示本研究获得的东方亚种 8 个单元型 A - H show 8 haplotypes of *O. t. dybowskii* in our study , ① the population in northwest of Songliao plain , ② the population in Wulanchabu altiplateau , ③ the population living through the winter in northwest of Songnen plain , ④ the population living through the winter in region of middle and lower reaches of yellow river , ⑤ living through the winter in region of middle and lower reaches of yangtze river

- [7] Pitra C, Lieckfeldt D, Alonso C. Population subdivision in Europe's great bustard inferred from mitochondrial and nuclear DNA sequence variation. *Molecular Ecology*, 2000, 9: 1165–1170.
- [8] Pitra C, Lieckfeldt D, Frahnert S, Fickel J. Phylogenetic Relationships and Ancestral Areas of the Bustards (Gruiformes: Otididae), inferred from Mitochondrial DNA and Nuclear Intron Sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2002, 23 (1): 63–74.
- [9] Hecht W. Studies on mitochondrial DNA in farm animals. *Genome Analysis in Domestic Animals*, 1990: 259–268.
- [10] Hutchison C A, Newbold J E, Potter S S, Edgell M H. Maternal inheritance of mammalian mitochondrial DNA. *Nature*, 1974, 251: 531–538.
- [11] Taberlet P, Waits LP, Luikart G. Noninvasive sampling: look before you leap. *Trends in Ecology and Evolution*, 1999, 14: 323–327.
- [12] Takezaki N, Nei M. Genetic distance and reconstruction of phylogenetic trees from microsatellite DNA. *Genetics*, 1996, 144: 389–399.
- [13] Zane L, Bargelloni L, Patarnello T. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology*, 2002, 11: 1–16.
- [14] Wenink P W, Baker A J, Tilanus M G J. Hypervariable-control-region sequences reveal global population structuring in a long-distance migrant shorebird, the dunlin (*Calidris alpina*). *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1993, 90: 94–98.
- [15] Lieckfeldt D, Schmidt A, Pitra C. Isolation and characterization of microsatellite loci in the great bustard, *Otis tarda*. *Molecular Ecology*, 2001, 10: 133–134.
- [16] Raymond M, Rousset F. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Heredity*, 1995, 86: 248–249.
- [17] Idaghdour Y, Broderick D, Korrida A, Chbel F. Mitochondrial control region diversity of the houbara bustard *Chlamydotis undulate* complex and genetic structure along the Atlantic seaboard of North Africa. *Molecular Ecology*, 2004, 13: 43–54.
- [18] Kong Y Q. Study on Mitochondrial DNA Genetic Diversity of Great Bustard (*Otis Tarda Dybowskii*) in China. Master's degree paper of Northeast Forestry University, 2003.

参考文献:

- [5] 田秀华, 王进军. 中国大鸨. 哈尔滨: 东北林业大学出版社, 2001.
- [18] 孔有琴. 中国大鸨东方亚种 (*Otis tarda dybowskii*) 线粒体 DNA 遗传多样性研究. 东北林业大学, 硕士学位论文, 2003.