

基于 Cyt *b* 基因探讨羚羊亚科原羚属系统发生关系

王 江^{1,2} 方盛国^{1*}

(1 浙江大学生命科学学院, 国家濒危野生动植物种质基因保护中心, 教育部濒危野生动物保护遗传学与繁殖生物学重点实验室, 杭州, 310029) (2 浙江理工大学生命科学学院生物化学研究所, 杭州, 310018)

摘要: 原羚属物种在羚羊亚科中的分类地位尚存在很多争议。本文测定了原羚属的黄羊和藏原羚细胞色素 *b* 基因全序列 (1 140 bp), 并与牛科其它属 31 个种的同源序列进行比较, 对其碱基组成变异情况及核苷酸序列差异进行了分析。基于细胞色素 *b* 基因全序列, 用简约法 (MP)、邻接法 (NJ) 和似然法 (ML) 构建了系统进化树。结果表明: 黄羊和藏原羚的序列差异为 3.78%, 颠换数目近乎为 0, 其突变远未饱和; 原羚属内黄羊和藏原羚为不同种, 单系发生; 原羚属与赛加羚羊属、犬羚属及跳羚属等并系发生, 原羚属隶属于羚羊亚科, 应为独立属; 羚羊亚科组成属间多为并系起源。根据序列差异值 2%/百万年的细胞色素 *b* 分子钟, 推测黄羊和藏原羚分歧时间大约为 1~2 百万年; 原羚属与羚羊亚科其它属分歧时间大约在 5.7~8 百万年。

关键词: 羚羊亚科; 原羚属; 细胞色素 *b*; 系统发育树

中图分类号: Q754

文献标识码: A

文章编号: 1000 - 1050 (2005) 02 - 0105 - 10

Molecular Phylogenetic Relationships for *Procapra* in Antilopinae (Artiodactyla, Bovidae) Based on Sequence of Mitochondrial Cytochrome *b* Gene

WANG Jiang^{1,2} FANG Shengguo^{1*}

(1 College of life sciences, Zhejiang University, State Conservation Center for Gene Resources of Endangered Wildlife, and Key Laboratory of Conservation Genetics and Reproductive Biology for Endangered Wild Animals of the Ministry of Education, Hangzhou, 310029, China)

(2 Institute of Biochemistry, College of life sciences, Zhejiang sci-tech university, Hangzhou, 310018, China)

Abstract: The phylogenetic relationships between species in genus *Procapra* and other genera of subfamily Antilopinae are unclear. Total DNA of Mongolian gazelle and Tibetan gazelle samples were extracted and Cyt *b* complete genes were sequenced (samples of the Mongolian gazelle and the Tibetan gazelle were collected from Inner Mongolian Autonomous region and Sichuan province respectively). Through comparison between the Cyt *b* complete gene determined in this study and those of 31 species in the family Bovidae available from GeneBank, the sequence divergence, base composition and base substitutions among these sequences were analyzed. The phylogenetic trees were constructed by most parsimonious (MP), neighbor-joining (NJ) and maximum-likelihood (ML) methods. The bootstrap values were calculated from 1 000 replicates for MP tree and NJ tree and 100 replicates for ML tree. Our study demonstrates that the Mongolian gazelle (*Procapra gutturosa*) and Tibetan gazelle (*Procapra picticaudata*) share the closest affinity and that they occupy the basal position in the Antilopinae. *Procapra* is monophyletic in all analyses (MP, NJ and ML trees). The sequence divergence between Mongolian gazelle and Tibetan gazelle was 3.78%. Phylogenetic relationship between Genera of Antilopinae are more paraphyletic than monophyletic. Base on the Cyt *b* molecular clock (2%/million year), the divergence time between the Mongolian and Tibetan gazelles was estimated to 1 - 2 million years before present and 5.7 - 8 million years before present between genera *Procapra* and others Genera of Antilopinae.

Key words: Antilopinae; *Procapra*; Cytochrome *b*; Phylogenetic tree

原羚属 (*Procapra*) 物种分布于中国、蒙古、锡金。该属包括普氏原羚 (*P. przewalskii*)、黄羊

基金项目: 国家林业局濒危野生动物基因资源收集专项资助

作者简介: 王江 (1972 -), 男, 硕士, 工程师, 主要从事保护遗传学研究; 现在浙江理工大学生命科学学院生物化学研究所工作。

E-mail: jwang2002wu@sohu.com

收稿日期: 2004 - 03 - 19; 修回日期: 2004 - 10 - 24

* 通讯作者, correspondence author, E-mail: sgfang@mail.hz.zj.cn

(*P. gutturosa*) 和藏原羚 (*P. picticaudata*), 其中普氏原羚为我国特有种, 隶属于牛科羚羊亚科, 其地理分布呈现明显的系统替代现象 (王宗祯等, 1963; 刘明玉等, 2000)。有关其属级和属内各物种的分类地位历来争论较多。Sokolov (1953) 根据眶下凹窝退化过渡特征认为原羚属虽然与羚羊属 (*Gazella*) 有明显差异, 但只是亚属差异, 鹅喉羚 (*G. subgutturosa*) 为二者的中间类型, 原羚属应为羚羊属的亚属。许多学者根据它们的头骨、角形、毛色、齿系特征, 认为原羚属物种为非典型羚羊, 它们应作为独立属——原羚属, 并认为原羚属包含 3 个种即藏原羚、普氏原羚和黄羊 (Simpson, 1945; Groves, 1967; Sokolov, 1979; 刘明玉等, 2000)。有时黄羊也被另列为一属——黄羊属 (*Prodorcas*) (Groves, 2000; 刘明玉等, 2000)。

随着分子系统学及 DNA 分子技术的发展, 从 DNA 水平研究物种亲缘关系已逐渐成为一种手段。Gatesy 等 (1997) 通过形态学和 rDNA 数据对藏原羚, Kuenetsova 和 Kholodova (2002) 通过 12S rRNA 和 16S rRNA 数据对黄羊作了属级间系统发育关系分析。Gatesy 等 (1997) 认为原羚属 (仅藏原羚) 应归属于羚羊亚科羚羊族 (Antilopini)。而 Kuenetsova 和 Kholodova (2002) 的结果与经典分类较为相悖, 认为原羚属 (仅黄羊) 与羚羊亚科岛羚族 (Neotragini) 犬羚属 (*Madoqua*) 亲缘关系最近, 聚为单系群。由于分子数据在属级分类上的争议和属内物种分子比较背景资料的缺乏, 因而有必要采用合适的分子遗传标记对其属级和属内系统发育关系作进一步研究。由于线粒体 DNA (mtDNA) 细胞色素 *b* (Cytochrome *b*) 蛋白编码基因进化速度快, 在哺乳动物中序列长度高度保守, 易于同源比对, 结构和功能在系统分析中易于应用等特点, 已成为研究种内和近缘种间系统发育的理想工具之一 (Irwin *et al.*, 1991; Hassanin and Douzery, 1999)。它的部分和全长序列已被广泛应用解决反刍类偶蹄目科内 (Randi *et al.*, 1998; Hassanin and Douzery, 1999)、属内 (Birungi and Arcander, 2001)、近缘种间 (Groves and Shields, 1996; Hassanin and Pasquet, 1998; Rebholz and Harley, 1999)、种内 (Schreliker *et al.*, 1999) 近 20~30 百万年内的系统进化发育关系。为探讨黄羊和藏原羚及原羚属与其近缘属物种之间的系统进化关系, 我们测定羚羊亚

科原羚属黄羊和藏原羚及羊亚科斑羚和鬣羚的 Cyt *b* 基因全序列, 并与牛科其它亚科 (表 1) 共 41 个个体 33 个种的 Cyt *b* 基因序列进行比较分析。

1 材料与方法

1.1 材料

藏原羚 (3 个)、斑羚 (*Capricornis crispus*) (1 个)、鬣羚 (*Nemorhaedus caudatus*) (1 个) 的干皮标本来自四川, 各样品的保存年代不详。黄羊肌肉样品 (3 个) 来自内蒙古满洲里, 1994 年野外猎捕, 于 -20℃ 保存至今。其余 31 个相关研究物种的 Cyt *b* 基因全序列来自 GenBank (表 1)。

1.2 DNA 提取和 PCR 扩增

陈旧皮张标本中总 DNA 的提取参见饶刚等 (2001) 方法并加以改进。肌肉样品中总 DNA 的提取参见萨姆布鲁克和拉塞尔 (2002) 方法。PCR 引物使用曹丽荣等 (2003) 改进后 Cyt *b* 基因全序列特异性引物, 引物序列为:

L14724 5' - GATATGAAAAACCATCGTTG - 3'

H15915 5' - CCTTCTCTCGTTTACAAGAC - 3'

PCR 反应在 PTC-200 Peltier Thermal cycler (MJ Research, Inc. USA) 上进行。反应体系为 25 μ l (1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 1.25 U Taq 酶和 PCR 缓冲液, 0.4 mg/ml BSA)。反应程序为: 95℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 1 min, 45℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 1.5 min, 并进行 35 个循环; 72℃ 延伸 10 min。

1.3 纯化与测序

扩增得到的 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 目的带切下后用 UNIQ-10 柱式 PCR 产物回收试剂盒 (上海生工 (Sangon) 生产) 纯化回收。将 Cyt *b* 的 PCR 纯化产物克隆到 pMD18-T Vector 中 (TAKARA, 大连), 将阳性克隆用 M⁺/M13⁻ 引物进行双向测序。

1.4 DNA 序列的数据处理

用 Megalign 软件 (DNASTar Inc. 1996) 对测定序列和从 GeneBank 中下载的同源序列进行排序。用 ClustalX1.8 软件 (Thompson *et al.*, 1997) 进行 Cyt *b* 基因全序列的比对。用 MEGA2.1 (Kumar *et al.*, 2001) 软件计算不同序列间的碱基替代数、变异位点、简约信息位点数、转换颠换百分比、转换/颠换比率。用 DNASTAR 软件计算两两序列的遗传相似度和序列差异百分比。基因突变是否饱和采

表 1 本研究所用物种、登录号和文献列表

Table 1 The list of species, sequence accession numbers, and reference used in this study

物种 Species	亚科 Subfamily	登录号 Genbank accession numbers	文献 Reference
苍羚 <i>Gazella dama ruficollis</i>	Antilopinae	AF025954	Matthee and Robinson, 1999
格氏羚 <i>Gazella granti</i>	Antilopinae	AF034723	Hassanin and Douzery, 1999
鹅喉羚 <i>Gazella subgutturosa</i>	Antilopinae	AF036282	Hassanin and Douzery, 1999
印度羚 <i>Antilope cervicapra</i>	Antilopinae	AF022058	Matthee and Robinson, 1999
长颈羚 <i>Litocranius walleri</i>	Antilopinae	AF249974	Matthee and Davis, 2001
赛加羚羊 <i>Saiga tatarica</i>	Antilopinae	AF064487	Hassanin and Douzery, 1999
冈氏犬羚 <i>Madoqua guentheri</i>	Antilopinae	AF022071	Matthee and Robinson, 1999
柯氏羚 <i>Madoqua kirkii</i>	Antilopinae	AF022070	Matthee and Robinson, 1999
跳羚 <i>Antidorcas marsupialis</i>	Antilopinae	AF022054	Matthee and Robinson, 1999
小岩羚 <i>Raphicerus campestris</i>	Antilopinae	AF0220068	Matthee and Robinson, 1999
沙氏岩羚 <i>Raphicerus sharpei</i>	Antilopinae	AF022050	Matthee and Robinson, 1999
黑耳岩羚 <i>Raphicerus melanotis</i>	Antilopinae	AF022053	Matthee and Robinson, 1999
侏羚 <i>Ourebia ourebi</i>	Antilopinae	AF320574	Birungi and Arctander, 2001
岛羚 <i>Neotragus moschatus</i>	Antilopinae	AJ222683	Hassanin and Douzery, 1999
岛羚 <i>Neotragus moschatus livingstonianus</i>	Antilopinae	AF022069	Matthee and Robinson, 1999
岛羚 <i>Neotragus moschatus zuluensis</i>	Antilopinae	AF022051	Matthee and Robinson, 1999
山羚 <i>Oreotragus oreotragus</i>	Antilopinae	AF022052	Matthee and Robinson, 1999
藏羚 <i>Pantholops hodgsoni</i>	Antilopinae	AF034724	Hassanin <i>et al.</i> , 1998
高加索山羊 <i>Capra caucasica</i>	Caprinae	AF034738	Hassanin <i>et al.</i> , 1998
家山羊 <i>Capra hircus</i>	Caprinae	AF034737	Hassanin <i>et al.</i> , 1998
亚洲山羊 <i>Capra sibirica</i>	Caprinae	AF034734	Hassanin <i>et al.</i> , 1998
岩羊 <i>Pseudois nayaur</i>	Caprinae	AF500196	曹丽荣等, 2003
鬘羊 <i>Ammotragus lervia</i>	Caprinae	AF034731	Hassanin <i>et al.</i> , 1998
斑羚 <i>Capricornis crispus</i>	Caprinae	D32191	Chikuni <i>et al.</i> , 1995
鬘羚 <i>Nemorhaedus caudatus</i>	Caprinae	U17861	Groves and Shields, 1996
土耳其盘羊 <i>Ovis aries</i>	Caprinae	NC001941	Hiendleder <i>et al.</i> , 1998
水羚 <i>Kobus ellipsiprymnus</i>	Reduncinae	AF022059	Matthee and Robinson, 1999
短角羚 <i>Pelea capreolus</i>	Peleinae	AF022055	Matthee and Robinson, 1999
黑斑羚 <i>Aepyceros melampus</i>	Aepycerotinae	AF022056	Matthee and Robinson, 1999
麋羚 <i>Alcelaphus buselaphus</i>	Alcelaphinae	AF016640	Matthee and Robinson, 1999
麦氏小羚羊 <i>Cephalophus maxwellii</i>	Cephalophinae	AF153894	Bettine and Terence, 2001
旋角羚 <i>Addax nasomaculatus</i>	Hippotraginae	AF034722	Hassanin <i>et al.</i> , 1998
原牛 <i>Bos taurus</i>	Bovinae	NC001567	Hauswirth and Laipis, 1982
黄羊 bosh1	Antilopinae	登录中	This study
黄羊 bosh2	Antilopinae	登录中	This study
黄羊 bosh4	Antilopinae	登录中	This study
藏原羚 bosh1	Antilopinae	登录中	This study
藏原羚 bosh2	Antilopinae	登录中	This study
藏原羚 bosh3	Antilopinae	登录中	This study
鬘羚 bosh1	Caprinae	登录中	This study
斑羚 bosh8	Caprinae	登录中	This study

bosh1, bosh2, bosh4 分别代表黄羊 3 个个体; bosh1, bosh2, bosh3 分别代表藏原羚 3 个个体; bosh1 代表 1 个鬘羚个体; bosh8 代表 1 个斑羚个体

bosh1, bosh2, bosh4 denote three Mongolian gazelle samples; bosh1, bosh2, bosh3 denote three Tibetan gazelle samples; bosh1 denotes a Serow samples; bosh8 denotes a Goral samples

用转换颠换散点分析 (Birungi and Arcander, 2001)。使用 PAUP 4.0b8 软件 (Swofford, 1998) 构建邻近 NJ (Neighbor-joining) 树、开启式功能搜寻最简约 MP (most parsimonious) 树和 TBR (tree-bisection-reconnection) 法搜寻最大似然 ML (Maximum-likelihood) 树。依据所获得转换/颠换平均比率, MP 和 ML 树采取加权 (Weighting) 系数 (Masatoshi Nei and Sudhir Kumar, 2002)。根据牛亚科处于牛科系统分类的基础地位 (Gatesy *et al.*, 1997; Reza and Moran, 2000; Matthee and Davis, 2001), 使用牛 (*Bos taurus*) 作为外群。系统简约信息分析使用步长 (Tree length), 一致性指数 (consistency index, CI)、保留指数 (retention index, RI)、同型指数 (homoplasy index, HI) 和重复衡量一致性指数 (rescaled consistency index, RCI) 评估。NJ 和 MP 系统树各分枝的置信度由 1000 次自举 (Bootstrap) 重复检测; ML 系统树分枝置信度由 100 次自举重复检测。

2 结果

2.1 碱基组成及基因序列差异

41 条 Cyt *b* 基因序列中, A、T、C、G 碱基平均含量分别为 31.4%、26.6%、28.7%、13.3%, 密码子第三位点 G 碱基平均总含量为 6.1%。原羚属黄羊和藏原羚 6 条基因序列中, A、T、C、G 碱基平均含量为 31.5%、27.3%、28.0%、13.2%, 密码子第三位点 G 碱基含量为 5.0%。原羚属种内和种间及相关物种基因序列差异百分比 (表 2) 显示出: 原羚属种内和种间均有较高的遗传相似性, 黄羊种内序列差异值为 1.26% ~ 1.91%, 平均为 1.51%; 藏原羚种内序列差异值为 0.18% ~ 0.9%, 平均为 0.6%; 属内二种间序列差异平均值为 3.78%。原羚属种间序列差异平均值 (3.78%) 与犬羚属种间序列差异平均值 (2.28%) 较近; 同比而言, 羚羊亚科羚羊属、小岩羚属内种间序列差异值较大分别为 9.35% 和 8.84%。原羚属与羚羊亚科其它属级序列差异百分比显示出: 与赛加羚羊属、跳羚属遗传同源相似性较高, 序列差异平均值分别为 12.06% 和 13.14%; 与岛羚属同源相似性最小, 差异值为 14.93%。羚羊亚科内属间相互比对差异平均值为 11.09% ~ 17.38%, 印度羚属与羚羊属差异最小为 11.09%; 犬羚属与岛羚属差异最

大为 17.38%。原羚属黄羊和藏原羚与羚羊亚科其它属物种对比发现均与赛加羚羊最近, 差异值分别为 12.34% 和 11.75%; 分别与岛羚、山羚相距最远, 差异值分别为 15.29% 和 14.93%。作为外群的牛和内群各种之间序列差异值为 15.64% ~ 19.65%, 平均 17.39%; 与原羚属平均差异值为 16.5%。

2.2 核酸变异方式

33 个物种间核苷酸碱基的变异存在很大的差异: 平均替换数为 151 个, 在密码子的第三位点中存在 95 个变异, 占总变异位点的 62.91%; T \leftrightarrow C、A \leftrightarrow G 的转换数分别为 87 个和 30 个, A \leftrightarrow C、A \leftrightarrow T、T \leftrightarrow G 和 C \leftrightarrow G 的颠换数分别为 20 个、10 个、2 个和 2 个。原羚属黄羊和藏原羚平均替换数为 43 个, 在密码子的第三位点中存在 29 个变异, 占总变异位点的 67.4%; T \leftrightarrow C、A \leftrightarrow G 的转换数分别为 28 个和 14 个, A \leftrightarrow C、A \leftrightarrow T、T \leftrightarrow G 和 C \leftrightarrow G 的颠换数分别为 1、0、0 和 0 个。黄羊和藏原羚种内平均替换数分别为 17 和 7 个, 在密码子的第三位点中存在 15 和 6 个, 分别占总变异位点的 88.2% 和 85.7%, 且均为转换。从表 2 可看出: 黄羊和藏原羚种内转换与颠换比值 (T_s/T_v) 近乎为无穷大 (分别为 17/0 和 7/0), 二者种间 T_s/T_v 为 43 (43/1)。原羚属与羚羊亚科其它属间转换颠换比值 (T_s/T_v) 在 2.76 ~ 11.37:1 之间 (106 ~ 141 T_s , 12 ~ 43 T_v)。羚羊亚科属间转换颠换比值在 2.5 ~ 11.4:1 之间 (103 ~ 165 T_s , 12 ~ 53 T_v)。原羚属物种与外群牛转换颠换比值为 2.92:1 (140 T_s , 48 T_v)。

羚羊亚科属内、属间, 羚羊亚科与外群的序列差异及转换 (T_s)、颠换 (T_v) 数散点饱和图见图 3 (a、b、c)。原羚属及羚羊亚科属内、属间随着序列差异比提高, 其碱基替换数均伴有线性提高, 但羚羊亚科各属内、属间突变均未达到饱和。在羚羊亚科与外群的饱和分析比较中, 所有颠换位点和转换位点中仅有第三转换位点 (T_{s3}) 存在有饱和现象, 但羚羊亚科与外群突变仍未完全达到饱和临界。

2.3 系统进化树

基于 41 条 33 个牛科物种全序列 (568 个核酸变异位点, 435 个简约信息位点) 获取最大简约 MP 树 (开启搜寻) 和 NJ 树, 4 倍加权的 MP 树和 NJ 树 (根据 T_s/T_v 接近于 4, 采用 4 倍加权, 自举引导值 1 000 次), 最大似然 (ML) 树 (TBR 法搜

表 2 羚羊亚科和外群(原牛) Cyt b 基因全序列差异百分比(下三角)和转换数/颠换数(上三角)

Codes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
1		73/8	108/11	116/14	125/19	124/18	136/21	137/20	140/20	133/20	136/20	141/20	131/26	137/26	139/23	154/23	157/28	165/27	130/18	159/42	163/40	170/43	170/51
2	7.12		106/13	114/16	128/23	127/20	127/23	129/22	130/22	126/22	128/22	131/22	141/33	136/33	126/25	147/25	148/30	157/29	108/20	153/46	161/44	165/48	157/51
3	10.47	10.46		103/15	107/24	129/21	122/26	120/25	125/25	117/25	120/25	122/25	139/33	136/33	117/26	138/26	132/31	136/30	121/23	120/48	130/45	150/49	126/52
4	11.43	11.41	10.44		128/21	118/18	131/21	133/20	128/20	120/20	123/20	130/20	139/30	142/30	117/25	165/25	152/32	160/31	145/22	134/40	142/38	153/41	153/49
5	12.62	13.26	11.46	13.05		122/26	128/25	126/24	128/24	123/24	126/24	131/24	155/37	151/37	145/27	144/27	148/32	153/31	136/26	133/42	140/40	150/43	143/49
6	12.41	12.84	13.17	11.85	13		116/26	116/25	116/25	106/25	108/25	113/25	125/27	129/27	118/24	122/24	104/29	134/30	140/23	111/41	116/41	119/42	148/54
7	13.74	13.15	13	13.28	13.35	12.44		13/1	14/1	40/1	42/1	42/1	131/30	124/30	114/29	128/23	128/28	134/27	132/13	125/42	132/40	136/43	136/49
8	13.75	13.27	12.68	13.41	13.14	12.34	1.26		22/0	45/0	48/0	48/0	134/29	133/29	119/30	135/22	129/27	140/26	135/12	129/41	135/39	140/42	147/48
9	13.98	13.04	13.13	12.95	13.36	12.34	1.35	1.91		38/0	40/0	42/0	130/29	129/29	121/30	128/22	125/27	134/26	137/12	129/41	135/39	137/42	140/48
10	13.41	12.93	12.45	12.28	12.91	11.45	3.6	3.99	3.32		2/0	8/0	117/29	111/29	119/30	124/22	117/27	133/26	137/12	113/41	121/39	132/42	136/48
11	13.64	13.16	12.68	12.5	13.14	11.67	3.79	4.18	3.51	0.18		10/0	117/29	114/29	121/30	127/22	120/27	135/26	140/12	116/41	124/39	134/42	139/48
12	14.1	13.39	12.9	13.18	13.59	12.12	3.79	4.18	3.7	0.72	0.9		122/29	116/29	124/30	122/22	120/27	133/26	140/12	118/41	129/39	137/42	142/48
13	13.8	15.24	15.12	14.8	16.86	13.33	14.1	14.34	14	12.86	12.86	13.31		26/0	132/32	150/26	133./31	156/30	163/29	138/52	146/52	148/53	146/59
14	14.26	14.78	14.88	15.15	16.5	13.68	13.53	14.23	13.88	12.3	12.53	12.75	2.28		126/32	146/26	135/31	154/30	156/29	141/52	149/52	15/53	147/59
15	14.18	13.24	12.55	12.45	15.07	12.46	12.53	13.08	13.3	13.08	13.3	13.53	14.43	13.85		137/29	138/35	154/36	130/28	137/51	142/51	149/52	142/58
16	15.47	15.09	14.38	16.86	15.07	12.8	13.26	13.73	13.16	12.82	13.04	12.59	15.43	15.08	14.58		79/7	97/12	142/20	149/40	152/42	155/41	147/53
17	16.25	15.62	14.32	16.19	15.83	11.64	13.67	13.68	13.33	12.66	12.88	12.88	14.44	14.55	15.1	7.54		94/13	131/25	144/48	148/50	156/49	151/56
18	16.86	16.35	14.57	16.81	16.21	14.45	14.14	14.61	14.03	13.92	14.15	13.92	16.34	16.22	16.64	9.6	9.38		147/22	145/49	143/47	153/50	159/55
19	12.97	11.17	12.58	14.66	14.26	14.3	12.79	12.92	13.14	13.14	13.37	13.37	16.84	16.23	13.89	14.22	13.7	14.78	15/41	160/39	163/42	158/48	
20	17.65	17.48	14.75	15.28	15.38	13.33	14.68	14.92	14.92	13.55	13.78	14.01	16.7	16.94	16.47	16.59	16.86	16.97	16.93		9/2	32/1	139/44
21	17.8	17.99	15.35	15.78	15.75	13.78	15.05	15.29	15.29	14.02	14.25	14.71	17.42	17.66	16.95	17.04	17.32	16.63	17.44	0.99		36/3	147/42
22	18.75	18.69	17.45	17.05	16.91	14.11	15.72	15.97	15.73	15.26	15.5	15.73	17.65	17.89	17.66	17.18	17.94	17.8	18.02	2.93	3.4		148/45
23	19.4	18.28	15.64	17.7	16.85	17.76	16.26	17.1	16.5	16.15	16.39	16.62	17.95	18.08	17.48	17.53	18.22	18.85	18.07	16.06	16.56	17.01	

Codes 1 ~ 23 denote: *Gazella dama ruficollis*, *Gazella granti*, *Gazella subgutturosa*, *Antelope cervicapra*, *Liotragus walleri*, *Saiga tatarica*, *bosh2*, *bosh4*, *bosh1*, *bosh3*, *bosh1*, *bosh3*, *bosh2*, *Madoqua guentheri*, *Madoqua kirkii*, *Antidorcas marsupialis*, *Raphicerus campestris*, *Raphicerus sharpei*, *Raphicerus melanotis*, *Ourebia ourebi*, *Neotragus moschatus*, *Neotragus moschatus zuluensis*, *Neotragus moschatus livingstonianus*, *Bos taurus*

寻, 100 次自举重复检测): MP 树和 NJ 树基本相似, 发现 3 棵 MP 树 (步长 (length) = 2 507, CI = 0.307, RI = 0.499, HI = 0.693, RCI = 0.153, 树略)。4 倍加权 MP 树 (步长 = 9 350, CI = 0.280, RI = 0.429, HI = 0.720, RCI = 0.120) 和 NJ 树见图 1。除羚羊亚科藏羚属系统支持略有不同外, ML 树

(图 2) 相似于 MP 和 NJ 树。结果显示: 原羚属内黄羊和藏原羚及犬羚属内物种单系发生 (Monophyly); 原羚属与赛加羚羊属、犬羚属及跳羚属等并系发生 (Paraphyly), 原羚属隶属于羚羊亚科; 在 3 种树羚羊亚科组成属间基本上没有单系起源, 而多为并系起源。

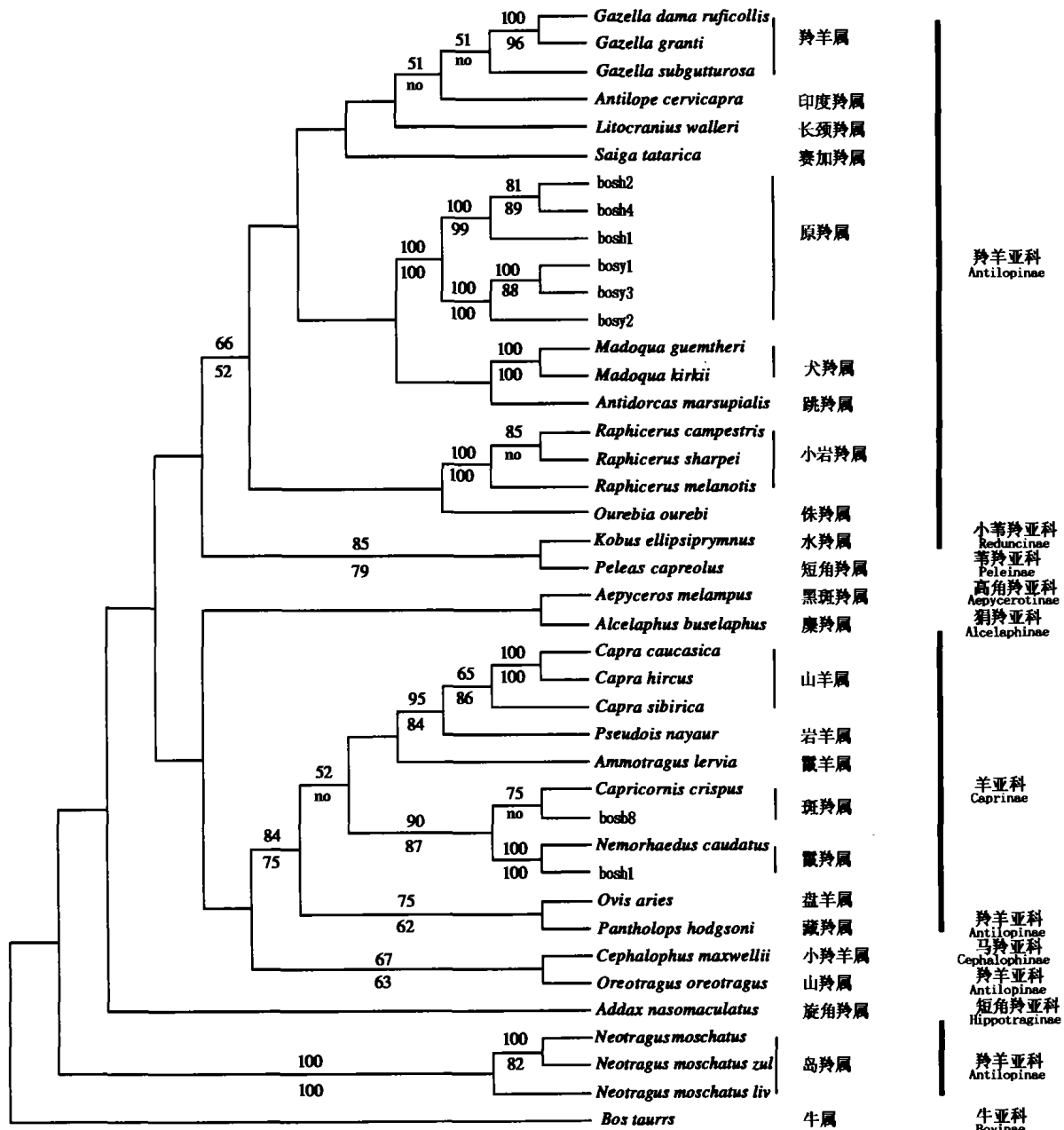


图 1 基于 Cyt b 基因序列构建的牛科动物邻近 (NJ) 和简约 (MP) (4 倍加权) 系统进化树

图中数字为自引导值, 枝上数字为邻近法自引导百分值, 枝下数字为简约法自引导百分值, “no” 表示数字在简约树上不显示。bosh1, bosh2, bosh4, bosyl, bosy2, bosy3, bosbl, bosb8 见表 1 注释

Fig. 1 Neighbor-joining and most parsimonious (four times weighting) tree based on the cytochrome b sequences date set for Bovidae. Numbers on the tree represent bootstrap value, numbers above branches are bootstrap percentages for neighbor joining; numbers below branches are bootstrap percentages for parsimony; “no” indicates that this node was absent on the parsimony tree. bosh1, bosh2, bosh4, bosyl, bosy2, bosy3, bosbl, bosb8 are noted in Table 1

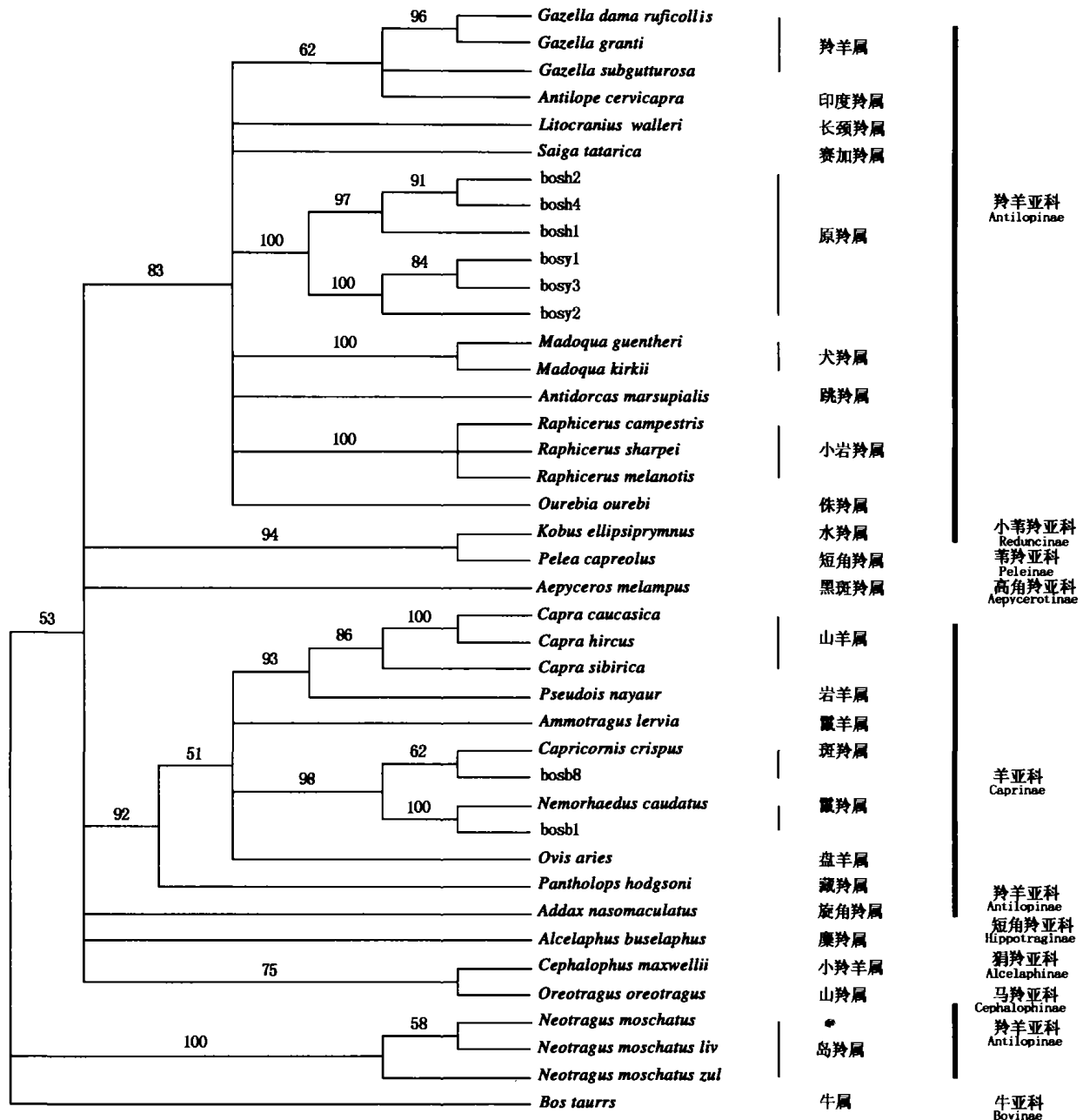


图 2 基于 Cyt b 基因序列构建的牛科动物最大似然 (ML) (4 倍加权) 系统进化树

图中数字为自引导值。bosh1, bosh2, bosh4, bosy1, bosy2, bosy3, bosb1, bosb8 见表 1 注释

Fig.2 Maximum-likelihood tree based on the cytochrome b sequences date set for Bovidae (four times weighting)

Numbers on the tree represent bootstrap value. bosh1, bosh2, bosh4, bosy1, bosy2, bosy3, bosb1, bosb8 are noted in Table 1

3 讨论

3.1 黄羊与藏原羚系统发育关系

随着分歧时间增加, 其物种亲缘关系变远, 同源基因序列差异值会增加, 颠换变化也随之增加 (Irwin *et al.*, 1991)。黄羊与藏原羚细胞色素 *b* 基因序列遗传差异值 (3.78%), 颠换数目近乎为 0,

充分显示黄羊和藏原羚有着较之其他牛科物种更近的亲缘关系。根据牛科狷羚亚科角马属 (*Connochaetes*) (Matthee and Robinson, 1999)、小苇羚亚科水羚属 (*Kobus*) (Birungi and Arctander, 2001) 和犬羚属 (本文研究) 其属内物种遗传差异较小时, 与同亚科属外物种的遗传差异就较大的现象 (属内遗传差异值为 2.05%、0.3%、2.28%; 属外

物种遗传差异值分别为 11.53% ~ 19.21%、7.7% ~ 14.7%、12.3% ~ 17.89%，利用黄羊和藏原羚与同亚科其它物种序列遗传差异值（属内 3.78% 遗传差异值，属外物种遗传差异值 12.06% ~ 14.93%）结合分子系统树支持黄羊和藏原羚同系发生，原羚属与羚羊亚科其它相近属并系发生（图 1、图 2）现象。我们赞成把黄羊和藏原羚列为同一属不同种，此属为独立属（原羚属 *Procapra*）观点（Simpson, 1945; Groves, 1967; Sokolov, 1979）。

本研究的所有牛科不同的物种间转换的差异与颠换差异呈现正相关，种间转换颠换比值最低为 2.4，所有数值均大于转换颠换比的临界值 2.0（Knight and Mindell, 1993），表现出高的转换偏倚（bias），这与牛科、马羚亚科小羚羊（Bettine and Terence, 2001）和食肉目犬科（Masuda and Yoshida, 1994）的研究结果基本一致。随着进化时间的增加，颠换的积累，哺乳动物的 mtDNA 转换偏倚会下降，转换颠换比值（Ts/Tv）趋向于稳定临界，饱和性会增加（Hedges *et al.*, 1991; Zhang and Oliver, 1993）。通过本研究中黄羊与藏原羚的转换颠换比值（43/1），羚羊亚科属间种间转换与颠换比值（Ts/Tv）在 2.5 ~ 11.4，羚羊亚科与外群转换颠换值（2.4 ~ 3.5）及饱和散点图线性化（图 3 a、b、c），说明牛科各物种间 Cyt *b* 基因序列的突变未达到饱和状态，尤其是黄羊与藏原羚之间 Cyt *b* 基因序列的突变远未饱和，随着进化时间推移，它们的遗传差异增加，转换可能趋向于饱和。根据黄羊和藏原羚转换远未饱和现象，我们选择牛科动物已校正的细胞色素 *b* 基因全序列每百万年 2% 的进化分子钟（Birungi and Arctander, 2001），推测黄羊和藏原羚的分歧时间大约在 1 ~ 2 百万年。

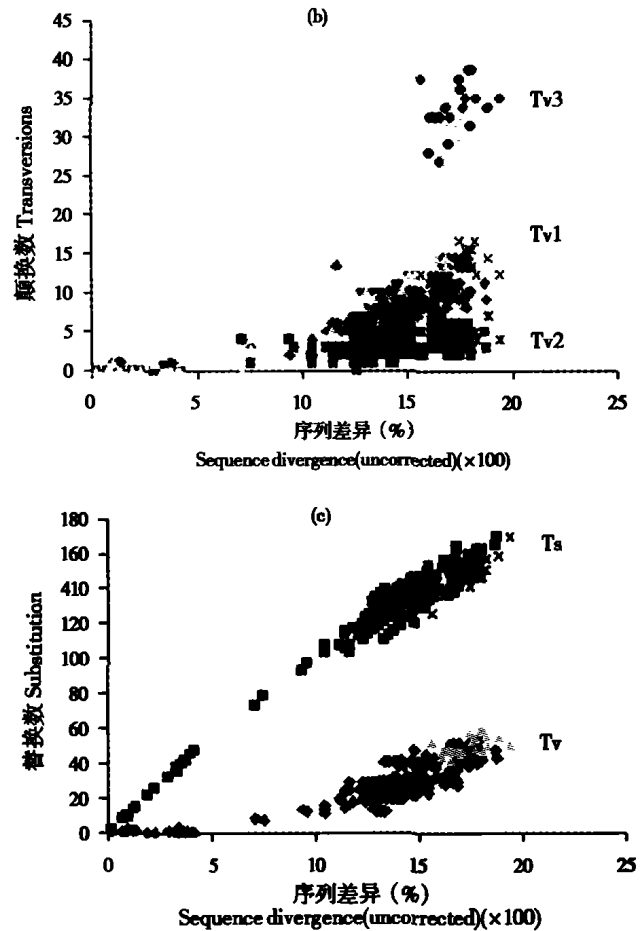
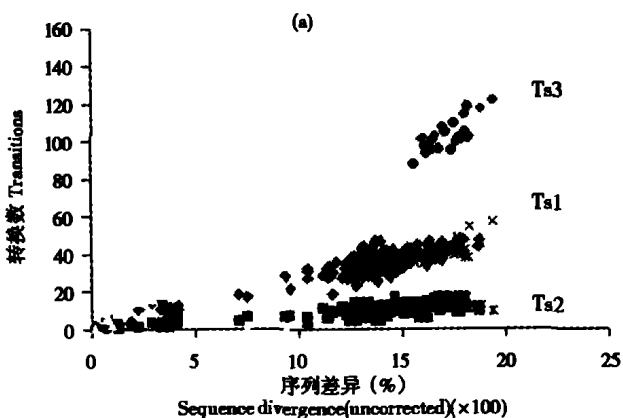


图 3 羚羊亚科细胞色素 *b* 基因核酸替换方式图

(a) 原羚属，羚羊亚科和外群比较（原牛）序列差异核酸转换图（第一 Ts1、第二 Ts2、第三 Ts3 密码子）；(b) 原羚属，羚羊亚科和外群比较（原牛）序列差异核酸颠换图（第一 Tv1、第二 Tv2、第三 Tv3 密码子）；(c) 原羚属，羚羊亚科和外群比较（牛）序列差异核酸替换图（替换 Ts、颠换 Tv）。图 (a) (b) “●、×、*” 表示羚羊亚科与外群比较；图 (c) “×、▲” 表示羚羊亚科与外群比较

Fig.3 Patterns of nucleotide substitutions among cytochrome *b* sequences of the Antilopinae

(a) Transitionsa (Ts) at first, second, and third codon positions (Ts1, Ts2, Ts3) against uncorrected sequence divergence (× 100) with the genera (*procapra*), between the genera of the Antilopinae and comparisons with the outgroups (*Bos taurus*); (b) Transversions (Tv) at first, second, and third codon positions (Tv1, Tv2, Tv3) against uncorrected sequence divergence (× 100) with the genera (*procapra*), between the genera of the Antilopinae and comparisons with the outgroups (*Bos taurus*); (c) Substitutions at transitionsa (Ts) and transversions (Tv) against uncorrected sequence divergence (× 100) with the genera (*procapra*), between the genera of the Antilopinae and comparisons with the outgroups (*Bos taurus*). In figure (a) (b), “●、×、*” indicated the Antilopinae comparisons with the outgroups (*Bos taurus*). In figure (c), “×、▲” indicated the Antilopinae comparisons with the outgroups (*Bos taurus*).

3.2 原羚属系统发育关系

尽管原羚属与赛加羚属、犬羚属及跳羚属物种基因序列具有较高的同源相似性, 但它们的序列差异均大于 12%; 此外进化系统树也不支持原羚属与赛加羚属、犬羚属聚为单系。所以我们的结果既不支持 Kuenetsova 和 Kholodova (2002) 从 12S rRNA 和 16S rRNA 认为原羚属与犬羚属具有单系姐妹群关系的假设; 也不支持原羚属与羚羊属亲缘关系更近 (Tikhonov and Bischof, 1995), 原羚属与赛加羚属亲缘关系较近的观点 (Groves, 2000); 而仅赞成原羚属归属于羚羊亚科的观点 (Gatesy *et al.*, 1997)。原羚属与赛加羚属、犬羚属及跳羚属等是并系发生, 起源于共同祖先、互为羚羊亚科下姊妹群。根据细胞色素 *b* 基因全序列每百万年 2% 的进化分子钟, 推测原羚属与赛加羚属的分歧时间大约在 5.7~6.3 百万年、原羚属与犬羚属的分歧时间大约在 6.1~7.2 百万年、原羚属与羚羊属的分歧时间大约在 6.4~7.1 百万年、原羚属与跳羚属的分歧时间大约在 6.2~6.8 百万年; 而和关系较远的岛羚属、藏羚属、山羚属分歧时间大约在 7~8 百万年。

我们的细胞色素 *b* 基因全序列数据分析羚羊亚科所得到的基因进化树, 与传统分类不太相符合。主要是岛羚属、山羚属、藏羚属三属的分类地位, 山羚属与马羚亚科小羚羊属聚为一支, 岛羚属单列为一支, 藏羚属似乎更应为羊亚科的基础进化支。基于羚羊亚科 Cyt *b* 基因进化树与传统分类地位的差异, 下一步研究工作应选择多个分子遗传标记 (包括线粒体和核基因) 结合传统分类构建进化树, 以得出羚羊亚科真实的物种系统进化树。

致谢: 东北林业大学徐艳春博士提供了黄羊样品, 在此谨致谢意。

参考文献:

- Bettine J V, Terence J R. 2001. Retrieval of four adaptive lineages in Duiker Antelope: evidence from mitochondrial DNA sequences and fluorescence in situ hybridization. *Mol Phy Evol*, **20** (3): 409–425.
- Birungi J, Arctander P. 2001. Molecular systematics and phylogenetics of the reduncini (Artiodactyla: Bovidae) inferred from the analysis of mitochondrial cytochrome *b* gene sequences. *J Mammal Evol*, **8** (2): 125–147.
- Chikuni K, Mori Y, Tabata T, Salito M, Monma M, Kosugiyama M. 1995. Molecular phylogeny based on the kappa-casein and cytochrome *b* sequences in the mammalian suborder Ruminantia. *J Mol Evol*, **41** (6): 859–866.
- Gatesy J, Amato G, Vrba E S, Schaller G, DeSalle R A. 1997. Cladistic analysis of mitochondrial ribosomal DNA from the Bovidae. *Mol Phylogenet Evol*, **7**: 303–319.
- Groves C P. 1967. On the gazelles of the genus *Procapra* Hodgson, 1846. *Z Saugetierk*, **32**: 144–149.
- Groves C P, Shields G F. 1996. Phylogenetics of the Caprinae based on cytochrome *b* sequence. *Mol Phylogenet Evol*, **5** (3): 467–476.
- Groves C P. 2000. Phylogenetic relationships within recent Antilopini (Bovidae). In: Vrba S, Shaller G eds. *Antelopes, Deer, and Relatives*. New Haven and London: Yale University Press, 223–233.
- Hassanin A, Douzery E J. 1999. The tribal radiation of the family Bovidae (Artiodactyla) and the evolution of the mitochondrial cytochrome *b* gene. *Mol Phylogenet Evol*, **13** (2): 227–243.
- Hassanin A, Lecointre G, Tillier S. 1998. The “evolutionary signal” of homoplasy in protein-coding gene sequences and its consequences for a priori weighting in phylogeny. *C R Acad Sci III Sci Vie*, **321** (7): 611–620.
- Hassanin A, Pasquet E, Vigne J D. 1998. Molecular systematics of the subfamily Caprinae (Artiodactyla, Bovidae) as determined from cytochrome *b* sequences. *J Mammal Evol*, **5** (3): 217–236.
- Hauswirth W W, Laipis P J. 1982. Mitochondrial DNA polymorphism in a maternal lineage of Holstein cows. *Proc Natl Acad Sci, U. S. A*, **79** (15): 4686–4690.
- Hedges S B, Bezy R L, Maxson L R. 1991. Phylogenetic relationships and biogeography of xantusid lizards, inferred from mitochondrial DNA sequences. *Mol Bio Evol*, **8**: 767–780.
- Hiendleder S, Lewalski H, Wassmuth R, Janke A. 1998. The complete mitochondrial DNA sequence of the domestic sheep (*Ovis aries*) and comparison with the other major ovine haplotype. *J Mol Evol*, **47** (4): 441–448.
- Irwin D M, Kocher T D, Wilson A C. 1991. Evolution of cytochrome *b* gene of mammals. *J Mol Evol*, **32**: 128–144.
- Knight A, Mindell D P. 1993. Substitutions bias, weighting of DNA sequence evolution, and the phylogenetic positions of fea's viper. *Syst Biol*, **42** (1): 18–31.
- Kumar S, Tamura K, Jakobsen I B, Nei M. 2001. Phylogenetic and molecular evolutionary analysis were conducted using MEGA version 2.0.
- Kuznetsova M V, Kholodova M V. 2002. Molecular support for the placement of *saiga* and *procapra* in Antilopinae (Artiodactyla, Bovidae). *J Mam Evol*, **9** (4): 271–280.
- Masatoshi Nei, Sudhir Kumar 主编; 吕宝忠, 钟扬, 高莉萍等译. 2002. 分子进化与系统发育. 北京: 高等教育出版社, 116–120.
- Masuda R, Yoshida M C. 1994. A molecular phylogeny of the family Mustelidae (Mammalia, Carnivora) based on comparison of mitochondrial cytochrome *b* nucleotide sequence. *Zoo Sci*, **11**: 605–612.
- Mathee C A, Davis S K. 2001. Molecular insights into the evolution of the family Bovidae: a nuclear DNA perspective. *Mol Biol Evol*, **18** (7):

- 1220 - 1230.
- Mathee C A , Robinson T J. 1999. Cytochrome *b* phylogeny of the family bovidae: resolution within the alcelaphini, antilopini, neotragini, and tragelaphini. *Mol Phylogenet Evol*, **12** (1): 31 - 46.
- Randi E, Mucc N, Pierpaoli M, Douzery E. 1998. New phylogenetic perspectives on the Cervidae (Artiodactyla) are provided by the mitochondrial cytochrome *b* gene. *Proc R Soc London, series B*, **265**: 793 - 801.
- Rebholz W , Harley E. 1999. Phylogenetic relationships in the bovid subfamily Antilopinae based on mitochondrial DNA sequences. *Mol Phylogenet Evol*, **12**: 87 - 94.
- Reza S M , Moran C. 2000. Conservation within artiodactyls of an AATA interrupt in the IGF - I microsatellite for 19 - 35 million years. *Mol Biol Evol*, **17**: 665 - 669.
- Schreliker A, Seibold I, Notzold G , Wink M. 1999. Cytochrome *b* gene haplotypes characterize chromosomal lineages of Anoa, the Sulawesi dwarf buffalo (Bovidae: *Bubalus* sp.). *J Hered*, **90**: 165 - 176.
- Simpson G G. 1945. The principles of classification and a classification of mammals. *Bull Amer Mus Nat Hist*, **85**: 1 350.
- Sokolov I I. 1953. Experience of the natural classification of bovids (Bovidae). *roc of Zool Muz XIV*, Moscow.
- Sokolov V E. 1979. Systematic of Mammals. Moscow: Moscow Univ Press.
- Swofford D L. 1998. PAUP* . Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and Other Methods), Version 4, Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Thompson J D, Gibson T J, Plewiniak F. 1997. The Clustal X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, **24**: 4876 - 4882.
- Tikhonov A N, Bischof L. 1995. Phylogenetic relationships of the Antilopinae based on cranial morphology and mitochondrial DNA sequences. *Abstr 2d Europ Congr Mammal*, Southampton, **62**.
- Zhang Y P, Oliver A R. 1993. Mitochondrial DNA sequence evolution in the Arctoidea. *Proc Natl Acad Sci USA*, **90**: 9557 - 9561.
- 王宗祯, 汪松, 陆长坤, 张荣祖. 1963. 中国牛科动物的分类、分布和利用. *生物学通报*, (5): 24 - 30.
- 刘明玉, 解玉浩, 季达明. 2000. 中国脊椎动物大全. 沈阳: 辽宁大学出版社, 807 - 810.
- 饶刚, 李明, 牛屹东, 王静, 魏辅文, 方盛国. 2001. 陈旧皮张中 DNA 提取的新方法. *动物学杂志*, **36** (4): 53 - 57.
- 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 2002. 分子克隆实验指南 (第三版). 北京: 科学出版社.
- 曹丽荣, 王小明, 方盛国. 2003. 从细胞色素 *b* 基因序列差异分析岩羊和矮岩羊的系统进化关系. *动物学报*, **49** (2): 198 - 204.