

孔雀属孔雀线粒体细胞色素 *b* 基因全序列 分析及其系统进化研究^{*}

朱世杰, 常 弘, 张国萍, 王蔚, 徐其放
(中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275)

摘 要: 测定了中国分布的野生绿孔雀和人工驯养的蓝孔雀、杂色孔雀、杂交孔雀以及白孔雀共 5 个种或亚种或变种的个体的线粒体细胞色素 *b* 基因的长为 1 140 bp 的全序列。研究了其碱基组成及变异情况。结合 GeneBank 中真绿孔雀亚种、非洲孔雀、鸡以及鹌的线粒体细胞色素 *b* (*cytb*) 全序列, 利用 philip 套件分别构建了系统进化树。结果显示: 真绿孔雀和绿孔雀形成较接近的类群。蓝孔雀、杂色孔雀、杂交孔雀以及白孔雀形成较接近的类群。进化树结果显示白孔雀和杂色孔雀不能成为蓝孔雀的亚种。

关键词: 孔雀属; 细胞色素 *b*; 序列分析; 分子系统树

中图分类号: Q95 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2004) 06-0045-03

孔雀分类上为鸟纲、鸡型目、雉科、孔雀族、孔雀属。世界上有 2 种孔雀: 蓝孔雀 *Pavo cristatus* 和绿孔雀 *P. muticus* , 其中绿孔雀有 3 个亚种, 分别为帝王孔雀 *P. m. imperator* 、即云南亚种, 分布于缅甸东部、中国西南部的云南和泰国与印度支那地区; 缅甸绿孔雀 *P. m. spicifer* 、即印度亚种, 分布于印度阿萨姆东南部和缅甸西部; 真绿孔雀 *P. m. muticus* , 即指名亚种, 分布于印度尼西亚的爪哇和马来西亚。在中国, 绿孔雀现仅见于云南。绿孔雀分布的范围较小, 数量较少, 而蓝孔雀的分布广, 数量多, 而且一直是养殖的珍禽。据 Grahame (1991) 的介绍, 印度孔雀成功驯养至少 3 千年, 现在仍在大量养殖^[1] , 但出现了几个明显的突变, 如白色的白孔雀, 以及 1866 年 Sclater 定名的黑孔雀 *P. nigripennis* , 还有“杂色 Pied”孔雀、“黑肩 Black-shouldered”孔雀、“麦杆色 Oaten”孔雀和称为“Cameo”的蓝孔雀突变形态, 另外还有称为 Spalding 孔雀的杂交形态, 后者是雄黑孔雀与雌绿孔雀交配获得。其中白孔雀不仅可以相互交配繁殖, 而且还可以与蓝孔雀交配繁殖。有足够的证据表明白孔雀在人工饲养下已经可以形成一个新的稳定群体了。2000 年, 常弘等利用 Random Amplification of Polymorphic (RAPD) 技术对孔雀进行了遗传学研究^[2] 。本研究选择细胞色素 *b* 基因来探讨中国分布的野生绿孔雀和人工驯养的蓝孔雀、杂色孔雀、杂交孔雀和白孔雀共 5 个种或亚种或变种

的系统进化问题, 为孔雀的系统分类提供分子进化的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

所用材料见表 1。

表 1 本试验采用的鸟类材料
Tab 1 The Aves samples used in this research

鸟类名称	拉丁名或 英文名	线粒体细胞色素 <i>b</i> 基因 (或序列) 来源
白孔雀	White Peafowl	血液, 云南昆明
杂色孔雀	Pied Peafowl	血液, 广州英吉利孔雀场
杂交孔雀	Spalding Peafowl	血液, 广州英吉利孔雀场
蓝孔雀	<i>Pavo cristatus</i>	血液, 广州英吉利孔雀场
真绿孔雀	<i>P. m. muticus</i>	序列, GenBank—AF013763
帝王孔雀	<i>P. m. imperator</i>	血液, 云南昆明
非洲孔雀	<i>Afropavo congensis</i>	序列, GenBank—AF013760
鹌	<i>Coturnix</i>	序列, GenBank—AF109217
鸡	<i>Gallus</i>	序列, GenBank—AF028795

1.2 DNA 的扩增与序列测定

采用改进的高盐沉淀法^[3] 提取基因组 DNA。根据 GenBank 中已经报道的家鸡的线粒体全序列 (编号 GenBank—AF028795) 设计引物 P1、P2 进行 PCR 反应。

P1: 5'— atggcacc caacatccgaaat— 3';

P2: 5'— ttagtggttagtatttggtt— 3'。

* 收稿日期: 2004—01—07
基金项目: 广东省科技计划资助项目 (2003C60103)
作者简介: 朱世杰 (1979 年生), 博士研究生; 通讯联系人: 常弘; E-mail: ls106@zsu.edu.cn

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

为了确保整个基因都被重复测到, 使用了 2 对中间引物

P3: 5'-tacctgggttccttcgcct-3';
P4: 5'-aaactgcagccctcagaatgatatgtctca-3';
P5: 5'-cctatactatggctctacct-3';
P6: 5'-gctagtagcctcagagttt-3'.

PCR 反应条件为: 94 ℃预变性 2 min, 30 个循环, 每个循环包括 94 ℃30 s、58 ℃1 min、72 ℃2 min. 然后 72 ℃延伸 5 min, 4 ℃保存. 琼脂糖凝胶电泳检测后割胶纯化. T 载体连接, 克隆. 利用 ABI377 自动测序仪和 Perkin Elmer 公司的 Big Dyeterminator Cycle Sequencing Kit 对每个样品正反测 2 次以确保结果的准确性.

1.3 数据分析

结合从 GenBank 中下载的序列, 用 Megalign (DNASTar) 排序. 计算碱基组成、转换/颠换值. 利用 Bioedit 及手工加工多序列集, 使之满足构建系统树要求.

利用 Philip 软件对序列集进行进化树分析. 设置转换/颠换值为 2. 设置非洲孔雀、鸱、鸡为复后外类群. Bootstrap 检验, NJ 法和 MP 法都是设置 1000 个数据集. ML 法设置 100 个数据集.

2 结果与讨论

2.1 Cytb 全序列及碱基变异情况

共得到 5 条长度都约为 1 140 bp 的 DNA 序列. 不包括 3 个复合外类群共检测到 53 个突变位点. 序列中无碱基插入或缺失. 蓝孔雀 Cytb 序列中 4 种碱基比例 (%) 为: A=29. 13; G=11. 64; T=25. 37; C=33. 86; A+T=54. 51; C+G=45. 49. 杂色孔雀 Cytb 序列中 4 种碱基比例 (%) 为: A=29. 22; G=11. 55; T=25. 28; C=33. 95; A+T=54. 51; C+G=45. 49. 杂交孔雀 Cytb 序列中 4 种

碱基比例 (%) 为: A=29. 22; G=11. 55; T=25. 37; C=33. 86; A+T=54. 59; C+G=45. 41. 白孔雀 Cytb 序列中的 4 种碱基比例 (%) 为: A=29. 25; G=11. 72; T=25. 69; C=33. 33; A+T=54. 95; C+G=45. 05. 帝王孔雀 Cytb 序列中 4 种碱基的比例 (%) 为: A=28. 61; G=11. 99; T=25. 46; C=33. 95; A+T=54. 07; C+G=45. 93. 所测样品包括外类群的 Cytb 序列中 A+T 的含量明显高于 C+G 的含量. 序列差异及颠换转换情况见表 2. 序列中的转换明显比颠换多, C 与 T 之间发生的转换比 A 与 G 之间发生的多. 而替换大多发生于第 3 密码子上, 第 1 密码子较少.

2.2 系统发育分析

以非洲孔雀、鸱和鸡为复合外类群构建 MP、ML 和 NJ 树. Bootstrap 置信检验, MP 法和 NJ 法都采用 1000 个数据集. ML 法采用 100 个数据集. 图 1、2 为 3 种方法构建的系统进化树.

构建的 3 个系统进化树, 以 MP 法构建的树与 ML 法构建的树相似性较高. 但 NJ 法构建的树图同样准确的将绿孔雀、蓝孔雀分为 2 个类群. 结合表 2 中绿孔雀与蓝孔雀达到 3. 1% 的序列差异, 可以认为绿孔雀与蓝孔雀是 2 个不同的种. 这与 Kimball 等通过比较细胞色素 b 和 D loop 的序列后认为 2 种孔雀在 4~6 百万年前分化成 2 个种的观点一致^[5]. 从 3 个树图上都可以看出白孔雀、杂色孔雀和杂交孔雀都距蓝孔雀为近. 认为杂色孔雀是蓝孔雀的突变型, 因为其本身的遗传不稳定. 关于杂交孔雀, 它其实是绿孔雀与蓝孔雀在人工饲养条件下相互杂交的后代, 而绿孔雀和蓝孔雀都是孔雀族内的种, 杂交孔雀也是可育的. 杂交孔雀总体上羽色与蓝孔雀更相似, 有蓝孔雀的背上的黑白色纹理的羽毛, 眼周裸出部、颊部裸出部的颜色和头顶的冠羽等也与蓝孔雀的一样. 这些形态学上的证据

表 2 细胞色素 b 序列差异百分比 (对角线以下) 和转换/颠换数 (对角线以上)

Tah 2 Percentage divergence (below diagonal) and numbers of transition/transversions (above diagonal) for cytochrome b sequences

物种	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1 蓝孔雀		2/0	1/0	9/4	32/2	32/2	96/13	94/62	95/42
2 杂色孔雀	0.2		1/0	9/4	32/2	32/2	96/13	94/62	95/42
3 杂交孔雀	0.1	0.1		8/4	31/2	31/2	95/13	93/62	94/42
4 白孔雀	1.1	1.1	1.1		38/5	37/5	97/17	98/61	97/44
5 真绿孔雀	3.1	3.1	3.0	4.0		2/0	93/13	94/61	93/40
6 帝王孔雀	3.1	3.1	3.0	4.0	0.2		91/13	95/51	91/40
7 非洲孔雀	10.5	10.5	10.4	11.2	10.1	9.9		119/64	98/50
8 鸱	15.3	15.3	15.2	15.8	15.3	15.4	18.5		102/56
9 鸡	13.3	13.3	13.1	13.8	12.8	12.6	14.5	15.6	

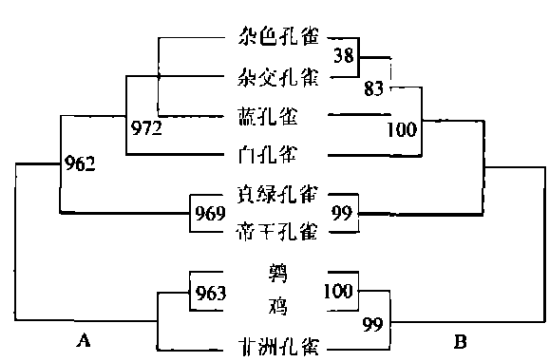


图 1 用 MP 法 (A) 和 ML 法 (B) 构建的孔雀属动物系统树

Fig 1 Phylogenetic tree of cytochrom *b* sequence of Aves constructed by MP method (A) and ML method (B)

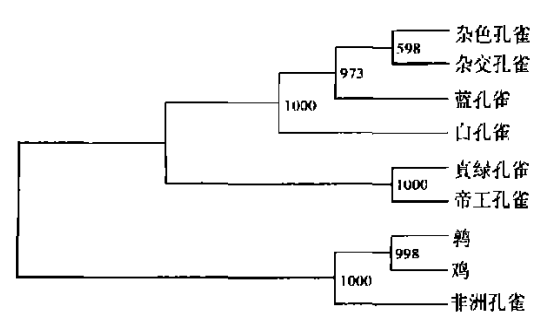


图 2 NJ 法构建的孔雀属动物系统进化树

Fig 2 Phylogenetic tree of cytochrom *b* sequence of Aves constructed by NJ method

每个位点上的核苷酸替换数用 K2-P 参数法估计。
置信值取 1000 复制序列统计^[4]

也支持杂交孔雀与蓝孔雀的亲缘关系更近。另外一个值得关注的问题是白孔雀的进化地位。白孔雀与蓝孔雀的序列差异程度已经接近亚种的差异水平。它与绿孔雀之间的序列差异甚至高于蓝孔雀与绿孔雀之间的序列差异。事实白孔雀是蓝孔雀最早的突变, *Somes* 等在 1993 年认为白孔雀和杂色 (Pied) 孔雀在 140 a 前或更早的时间已经很普遍了^[6], 但长期以来白孔雀与蓝孔雀都是可以相互杂交繁殖的, 没有生殖隔离, 长时间频繁的杂交可能是其与蓝孔雀遗传距离较大的原因。但鉴于它由蓝孔雀突变而来, 且不具备亚种形成所需要的特定地理区域或栖息地以及现在的形态学因素, 不支持它成为蓝孔雀的一个亚种, 而只是一个品系。

参考文献:

[1] GRAHAME I. 驯养动物的进化[M]. 驯养动物的进化翻译组译. 南京: 南京大学出版社, 1991: 357—360.

[2] 常 弘, 柯亚永, 苏应娟, 等. 野生与笼养绿孔雀种群的随机扩增多态 DNA 研究[J]. 遗传, 2002, 24(3): 271—274.

[3] 姜 泊, 张亚历, 周殿元. 分子生物学常用实验方法[M]. 北京: 人民军医出版社, 1996.

[4] KIMURA M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. [J]. Mol Evol, 1980, 16: 111—120.

[5] KIMBALL R T, BRAUN E L, LIGON J D. Resolution of the phylogenetic position of the Congo peafowl, *Afrapavo congensis*: a biogeographic and evolution enigma[J]. Proc R Soc Lond B, 1997, 264: 1517—1523.

[6] SOMES R G Jr, BURGER R E. Inheritance of the white and pied plumage color patterns in the indian peafowl (*Pavo cristatus*) [J]. J Heredity, 1993, 84(1): 57—62.

Phylogenetic Relationships Among *Pavo* Based on Complete Mitochondrial Cytochrome *b* Gene Sequence Variations

ZHU Shi jie, CHANG Hong, ZHANG Guo ping, WANG Wei, XU Qi fang
(School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: The phylogenetic relationship and classification of *Pavo* distributed in China were analyzed, based on mitochondrial cytochrome *b* gene sequence variations. Complete mtDNA *cyt b* gene was sequenced from individual of pied, *Pavo cristatus*, spalding, White *Pavo* and *P. m. imperator* with the *cyt b* sequences of four species in Aves. The divergence and base substitution among these sequences were analyzed. The phylogenetic tree, in agree with morphologic data, was reconstructed by Neighbor joining method, maximum parsimony method and maximum likelihood method. The molecular data show: *P. m. imperator* and *Pavo cristatus* are classified into two species. Pied, spalding and white *Pavo* are more related to *Pavo cristatus* than *P. m. imperator* because of lower interspecific difference. White *Pavo* and pied are not subspecies but mutant belonging to *Pavo cristatus*.

Key words: *Pavo*; cytochrome *b* gene; molecular phylogeny; phylogenetic tree