

新疆草兔的种群遗传结构和亚种分化

单文娟¹, 刘江², 马合木提·哈力克^{1,*}

(1. 新疆大学 生命科学与技术学院, 新疆 乌鲁木齐 830046; 2. 云南大学 生物资源保护与利用重点实验室, 云南 昆明 650091)

摘要: 新疆草兔 (*Lepus capensis*) 的群体遗传结构至今无系统的研究报道, 亚种水平的分类也长期存在争议。该文测定了形态分类上的新疆草兔 3 个亚种共 87 个个体的线粒体 DNA (mtDNA) 控制区(control region, D-Loop) 592 bp 的序列, 经分析发现 148 个多态性位点, 共定义了 44 个单倍型。新疆草兔的单倍型多样性(h , 0.977 ± 0.005)和核苷酸多样性(π , 0.064 ± 0.031)都较高, 显示了较高的遗传多样性。分子变异分析(AMOVA)结果显示, 4 个地理群体间的显著分化可能是由地理隔离造成的。群体遗传结构分析显示, 新疆草兔包含 4 个进化枝, 并且每个进化枝都对应特定的分布区域, 显示了明显的系统地理结构。该研究的结果支持形态分类上草兔西域亚种(*L.c. lehmanni*)的分类地位; 但中亚亚种(*L.c. centrasiaticus*)被分为两个独立的进化枝, 提示可能存在两个亚种; 帕米尔亚种(*L.c. pamirensis*)与其他亚种间的遗传距离在 13% 以上, 提示其可能已达到种的分化水平。

关键词: 草兔; 线粒体 DNA; 控制区; 群体遗传多样性; 亚种分化

中图分类号: Q959.836; Q349.1

文献标志码: A

文章编号: 0254-5853-(2011)02-0179-09

Genetic structure and subspecies divergence of *Lepus capensis* in Xinjiang

SHAN Wen-Juan¹, LIU Jiang²; Mahmut HALIK^{1,*}

(1. College of Life Sciences and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830046, China; 2. Laboratory for Conservation and Utilization of Bio-resource & Key Laboratory for Microbial Resources of the Ministry of Education, Yunnan University, Kunming 650091, China)

Abstract: To date, the genetic structure and genetic diversity of *Lepus capensis* in Xinjiang has not been systematically studied at the molecular level, and its subspecies taxonomic status has been under debate for years. According to traditional morphology, there are three subspecies of *L. capensis* distributed in Xinjiang: *L.c. centrasiaticus*, *L.c. lehmanni* and *L.c. pamirensis*. In this study, we determined 592 bp D-loop sequences of 87 cape hares from Xinjiang Province. Forty-four haplotypes were defined based on 148 polymorphic sites. Both the haplotype diversity (0.977 ± 0.005) and nucleotide diversity (0.064 ± 0.031) are high. F_{ST} P values are significantly high and no haplotype was shared among the four geographic populations, indicating that genetic differentiation among populations is significant. AMOVA shows that most of the genetic differentiation occurred among geographic groups, indicating that geographic isolation such as mountains and deserts might make an effective barrier against gene flow. Both the phylogenetic tree and median-joining network grouped 44 haplotypes into four distinct clades corresponding to four geographic areas, indicating an obvious phylogeographic pattern. Our data supported the subspecies status of *L. c. lehmanni*. The fact that haplotypes of *L. c. centrasiaticus* were grouped into two distinct clades suggests that this traditional subspecies should be considered as two subspecies. In addition, *L. c. pamirensis* shows a significantly higher sequence divergence compared to other subspecies, and the difference even reached the level of species.

Key words: *Lepus capensis*; mtDNA; Control region; Genetic structure; Subspecies

草兔 (*Lepus capensis*) 是世界上分布范围最广的兔属物种之一, 广泛分布于非洲、中东、中亚, 甚

至太平洋沿岸 (Hichem et al, 2008; Flux & Angermann, 1990; Hoffmann & Smith, 2005; Chapman

收稿日期: 2010-10-19; 接受日期: 2010-12-24

基金项目: 国家自然科学基金项目(31060152); 新疆维吾尔自治区高校科研计划青年教师科研启动基金项目(XJEDU2008S03); 新疆大学学院联合资助项目(XY080117); 新疆大学科研实训项目(XJU-SRT-10012)

*通讯作者(Corresponding author), 马合木提·哈力克(1959—), 维吾尔族, 男, 教授, 博士, 博士生导师。主要从事哺乳动物的保护遗传学及其分子进化研究, Tel and Fax: +86-991-8588001, E-mail: mahmuthalik@xju.edu.cn

第一作者简介: 单文娟, 女, 博士研究生, 研究方向为野生动物保护与分子遗传学

& Flux, 2008)。在我国分布于东北、华北、西北和长江中下游地区。由于草兔在全世界分布较广, 分布在不同地理区域的个体表现出对栖息地环境的适应性而具有不同的形态特征, 以及分布区重叠等使其亚种的划分到现在都没有澄清(Chapman & Flux, 2008)。

Luo(1988)对中国野兔的形态分类进行的系统研究指出, 中国草兔可分为 8 个亚种, 其中新疆分布有 3 个亚种, 分别为分布在东疆、吐鲁番盆地、焉耆盆地的中亚亚种(*L.c.centrasiatricus*); 分布在乌鲁木齐以西、塔里木盆地以北广大地区的西域亚种(*L.c.lehmanni*); 分布在帕米尔高原塔什库尔干的帕米尔亚种(*L.c.pamirensis*)。Wang(2003)得出一致观点, 但将中亚亚种和西域亚种分别称为甘肃亚种(*L.c.centrasiatricus*)和哈萨克亚种(*L.c.lehmanni*)。然而, 由于新疆地域辽阔, 高大山脉与平原交错分布, 绿洲、农牧与沙漠戈壁相间排列, 并且在新疆分布的这 3 个亚种之间被广阔的沙漠和山脉隔开, 使得草兔生存环境呈现出复杂的多样性。另外, 传统上针对新疆草兔的研究涉及的样品数量较少, 缺乏广泛的取样, 而且目前尚无分子方面系统的研究报道。

Wu et al(2005)应用 4 个线粒体基因对中国 9 种野兔的系统发育进行了研究, 并提示新疆可能存在两个以上的野兔新种, 但是该项研究仅仅包含了 3 个来自新疆的样品。在新疆境内, 雪兔和塔里木兔都具有比较集中的分布区域和特有的形态特征(Luo, 1988; Wang, 2003; Andrew & Yan, 2008)。因此, 在这两个物种的分布区域内存在新种的可能性较

小, 而新疆草兔的分布区域较广, 环境多样, 最有可能存在尚未发现的兔属物种。

从草兔在世界范围内的广泛分布来看, 它应该是进化最成功、适应性最强的兔属物种, 因此, 弄清草兔的群体历史和遗传结构对于理解整个兔属物种的进化历史具有重要的参考价值。线粒体 DNA 控制区由于进化速度快、变异位点多, 可以将近期分歧谱系区分开来。因此, 是一种探讨种内遗传结构、种群差异与生物地理关系等的有效遗传标记(Avise, 1992; Van et al, 2002; Yang et al, 2008)。本研究的目的就是通过测定新疆草兔线粒体 DNA 控制区序列, 结合系统发育和群体遗传学的分析方法来了解新疆草兔的群体遗传多样性和遗传结构, 利用多层次分子变异分析探讨山脉和沙漠戈壁等对草兔种群遗传结构的影响; 结合传统形态学的观点进一步探讨新疆草兔的亚种分化问题以及是否存在新种。

1 材料和方法

1.1 样品收集及采样点区域划分

本研究共收集到 87 个新疆草兔样品。样本采集地基本覆盖了新疆草兔分布区域(Luo, 1988; Wang, 2003)。在新疆草兔亚种分类的基础上, 结合新疆的山脉和沙漠戈壁等地貌特征, 将上述样品分为 4 大分布区域, 作为数据分析中的地理种群。样品详细信息和分布图见表 1 和图 1。其中南部和东部种群的草兔分别属于帕米尔亚种和中亚亚种, 北部和西部种群的草兔属于西域亚种。

表 1 本研究的样品信息
Tab. 1 Specimens examined in this study

亚种 Subspecies	种群 Population	采集地 Sites	样品数 Sample size	经度 Latitude	纬度 Longitude
西域亚种 <i>L.c.lehmanni</i>	北部 North	福海 Fuhai, FH	20	87.51	47.15
		青河 Qinggil, QH	2	90.37	46.71
		阿勒泰 Altay, ALT	1	88.14	47.86
		哈巴河 Habahe, HBH	4	86.41	48.05
		布尔津 Burqin, BRJ	2	86.92	47.70
		富蕴 Fuyun, FY	3	89.44	47.05
	西部 West	精河 Jinghe, JH	26	82.92	44.67
		温泉 Wenquan, WQ	1	81.08	44.95
中亚亚种 <i>L.c.centrasiatricus</i>	东部 East	哈密 Hami, HM	12	93.44	42.78
		博湖 Bohu, BH	3	86.53	41.95
帕米尔亚种 <i>L.c.pamirensis</i>	南部 South	塔什库尔干县 Taxkorgan, TX	13	75.22	37.76

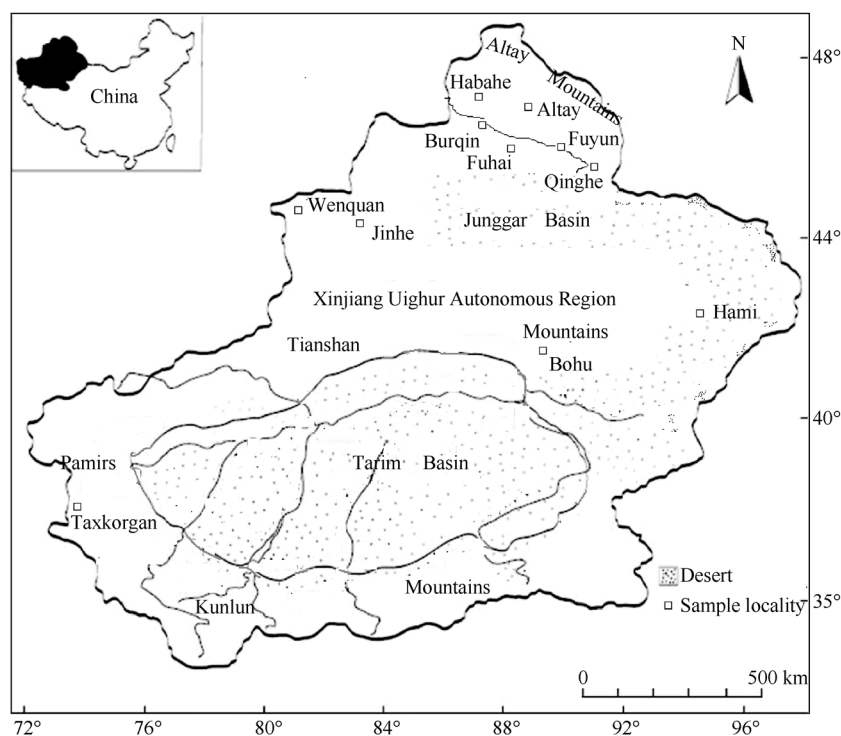


图 1 本研究所用样品的地理分布

Fig. 1 Approximate geographical distribution of DNA samples in this study

1.2 总 DNA 提取

本研究所收集的样品包括肌肉组织、新鲜毛皮及陈旧皮张样品, 采用经典的酚-氯仿方法提取 (Sambrook et al, 1989): 取适量组织, 加蛋白酶 K 消化过夜, 然后依次用饱和酚: 氯仿: 异戊醇 (25: 24: 1) 和氯仿: 异戊醇 (24: 1) 分别抽提 2 次, 再用无水乙醇沉淀和 70% 的乙醇洗涤, 离心甩干, 最后溶于 TE 中。

1.3 PCR 扩增

引物设计基于已发表的穴兔及其他一些兔属动物线粒体 DNA 序列 (Gissi et al, 1998; Conrad et al, 2004), 本研究所用引物为 5' -cat gca tat aag cca gta-3', 5' -atg cat ggg gat aag gtt tt-3'。PCR 反应条件为 94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 1 min 35 个循环。最后 72 °C 延伸 5~10 min。PCR 产物经凝胶电泳用上海华舜生物工程有限公司的小量胶回收纯化试剂盒进行纯化。纯化后得到的 PCR 产物直接作为模板, 使用 PE 公司的 BigDye™ Terminator Kit (V2.0), 根据厂家推荐的条件进行测序反应。测序反应产物经纯化后, 使用 Applied Biosystems Inc. 的 3730 全自动 DNA 序列仪电泳并由机器自动记录序列数据。每条序列均经过正反链双向测定, 以确保

序列的准确性。

1.4 数据分析

用 DNASTAR5.0 软件包中的 Editseq 和 Seqman 子程序进行基因片段的拼接合并, 用 ClustalW1.83 (Thompson et al, 1997) 排序。运用 MEGA 4 软件 (Tamura et al, 2007) 进行序列特征分析, 计算成对遗传距离 (p-distance)。运用 GenAlEx 软件 (Peakall & Smouse, 2007) 计算地理距离与遗传距离之间的相关性 (Mantel tests)。运用 Network4.1.1.2 软件 (Bandelt et al, 1999) (<http://www.fluxus-engineering.com>) 构建草兔种群的中介网络图 (median-joining network)。运用 Arlequin3.1 (Excoffier & Laval, 2005) (<http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3>) 软件计算单倍型多样性 (haplotype diversity, h)、核苷酸多样性 (nucleotide diversity, π)、基于各种群间的遗传分化指标 F-Statistics (F_{ST}) 值以及进行分子变异分析 (analysis of molecular variance, AMOVA) (Excoffier et al, 1992)、核苷酸错配分布 (mismatch distribution) 分析和包括 Tajima's D 值 (Tajima, 1989)、Fu 的 F_s 值 (Fu, 1997) 及其 P -value 在内的中性检验分析 (neutrality tests)。

系统树的构建采用邻接法——neighbor-joining, NJ(Saitou & Nei, 1987)和贝叶斯方法(Huelsenbeck & Ronquist, 2001),以穴兔(*Oryctolagus cuniculus*)和海南兔(*Lepus hainanus*)作为外群。NJ树用MEGA 4 (Tamura et al, 2007)软件构建,参数均采用默认设置。贝叶斯树用MRBAYES v3.04b (Ronquist & Huelsenbeck, 2003)构建。首先使用MODELTEST 3.7 (Posada & Crandall, 1998)程序选出HKY+I+G 作为适合本研究数据的最优核苷酸替换模型,具体参数为:Base=(0.3116 0.2910 0.0989), Nst=2, Tratio=5.9584, Rates =gamma, Shape =5.9584, Pinvar =0.4160。贝叶斯分析是以随机树开始,运行300 万代,每 100 代取样一次。在同样设置的参数下,我们运行两次。用于构建主要一致树的后验概率分布,是预先舍弃了似然率差异较大的前 7 500 次取样(Leaché & Reeder, 2002)。

2 结果与分析

2.1 新疆草兔 mtDNA D-loop 区的序列特征

在 87 条草兔 mtDNA D-loop 区 592 bp 的序列中,共发现 148 个多态性核苷酸位点,占全部碱基数的 25.08%;简约信息位点 128 个,其中转换(transition)26 个、颠换(transversion)6 个、插入/缺失(insertion/deletion)34 个和其他 62 个。将 13 个草兔采集地划分为 4 个地理种群,序列分析结果表明,4 个地理种群的 87 个样品中共存在单倍型 44 个(GenBank 序列号为 HQ699901~HQ699944),其中

东部种群 13 个、北部种群 12 个、西部种群 10 个和南部种群 9 个。4 种群间无共享单倍型。

2.2 草兔群体的遗传多样性及遗传结构

2.2.1 Mantel tests 分析 Mantel tests 分析结果(图 2)为:横轴遗传距离(GD)与纵轴地理距离(GGD)之间呈现明显的相关性,且 P 值为 0.010,小于 0.05 的显著水平。草兔各种群之间地理距离越大,遗传距离也越大。

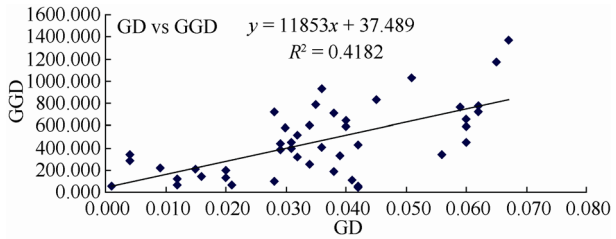


图 2 Mantel tests 分析结果
Fig. 2 Results of Mantel tests analysis
GD: 遗传距离 Genetic distance; GGD: 地理距离 Geographic distance.

2.2.2 遗传多样性 新疆草兔 4 个地理种群中,东部种群的核苷酸多样性 π 和单倍型多样性 h 最高,分别为(0.057 $\pm$ 0.029)和(0.971 $\pm$ 0.039),北部种群最低,分别为(0.015 $\pm$ 0.008)和(0.901 $\pm$ 0.027)。总的来说,新疆草兔具有较高的遗传多样性[核苷酸多样性(0.064 $\pm$ 0.031);单倍型多样性(0.977 $\pm$ 0.005),见表 2]。新疆草兔群体的 Tajima's D 和 Fu's F_s 的中性检验并不显著(分别为 -1.914 和 1.466, $P > 0.05$, 见表 2),核苷酸错配分析显示多峰分布(图未显示)。

表 2 基于草兔 mtDNA D-loop 区计算的遗传多样性及种群动力学参数

Tab. 2 Diversity and demographic parameters deduced from mtDNA D-loop sequences in <i>lepus capensis</i>						
种群 Population	样品数 Sample size	单倍型数 Number of haplotypes	核苷酸多样性(π) Nucleotide diversity	单倍型多样性(h) Haplotype diversity	Tajima's D	Fu's F_s
North	32	12	0.015 $\pm$ 0.008	0.901 $\pm$ 0.027	-1.914	1.466
West	27	10	0.019 $\pm$ 0.010	0.917 $\pm$ 0.023	0.585	3.287
East	15	13	0.057 $\pm$ 0.029	0.971 $\pm$ 0.039	0.892	0.091
South	13	9	0.028 $\pm$ 0.015	0.936 $\pm$ 0.051	1.090	1.361
总体 Total	87	44	0.064 $\pm$ 0.031	0.977 $\pm$ 0.005	0.410	0.508

2.2.3 遗传结构 AMOVA 分析显示,当种群间相距的远近程度和天然地理屏障将新疆草兔划分成不同地理组群时(表 3),地理组群间的变异,分别占 58.91%和 68.45%;将草兔群体各自独立为一组时,种群间的变异贡献率也较大,为 44.55%,且 P 值极

显著。
种群间的遗传分化指数 F_{ST} 值(对角线以下)(表 4)分析显示,新疆草兔各种群间 F_{ST} P 值均小于 0.01 的检验水平,且南部种群与其它种群间的 F_{ST} 值最大,其与北部、西部和东部种群的数值分

表 3 新疆草兔 mtDNA 单倍型分子变异等级分析(AMOVA)

Tab. 3 Hierarchical analysis of molecular variance (AMOVA) of mtDNA haplotypes of Cape hare in Xinjiang

分 组 Groups	分化指数			组群间	组群内各种群间	种群内
	F_{CT}	F_{SC}	F_{ST}	Among groups	Among populations within groups	Within populations
[北西][东][南][N W][E][S]	0.5891	0.3753*	0.7433*	58.91	15.42*	25.67*
[北西东][南][N W E][S]	0.6845	0.4407*	0.8235*	68.45	13.91*	17.65*
[北][西][东][南][N][W][E][S]	—	—	0.4455*	—	44.55*	55.45

* $P<0.01$.

别为 0.866、0.849 和 0.703。各种群间的基因交流均很小(均小于 1, 见表 4), 尤其是南部种群与其它 3 个种群之间的基因交流值最小。

表 4 新疆草兔 4 个地理种群的遗传分化指数及基因流

Tab. 4 F_{ST} (below the diagonal)and gene flow(above the diagonal) among the four populations of Cape hare in Xinjiang

种群 Population	北部 North	西部 West	东部 East	南部 South
北部 North		0.54	0.60	0.08
西部 West	0.479*		0.65	0.09
东部 East	0.456*	0.436*		0.21
南部 South	0.866*	0.849*	0.703*	

* $P<0.01$.

2.2.4 系统发育关系 NJ 树和贝叶斯树(图 3)显示, 新疆草兔 44 个单倍型被分为支持率较高的 4 个进化枝(Clade A~D), 每个进化枝均包含了绝大部分来自相同或相邻区域的样品, 如 Clade A 包含了绝大多数来自新疆西部和北部种群的单倍型; Clade B 和 D 中的单倍型分别全部来自新疆东部种群和南部种群; Clade C 中的样品主要来自新疆东部群体。虽然地理上相距较远的个别单倍型在进化枝上稍有交叉, 但仍可以看出新疆草兔群体具有明显的系统地理结构。

同时, 我们分析了基于进化树上(图 3)4 个进化枝间的遗传分化指数 F_{ST} 值(对角线以下)和种群间 ML 遗传距离(对角线以上)(表 5), 结果显示, 新疆草兔各进化枝的系群分化十分显著($P<0.01$), Clade D 与其他进化枝间的遗传距离(p-distance)最大, 均达到 13%以上, CladeA、B 和 C 间的遗传距离在 6.5%~7.7%之间。

新疆草兔 mtDNA 控制区 44 个单倍型的中介网络图(图 4)更清晰直观地显示出新疆草兔群体的系统地理结构。与系统发育分析一样, 网络图也明显的将 44 个单倍型分为 4 个进化枝, 其中 Clade D 中

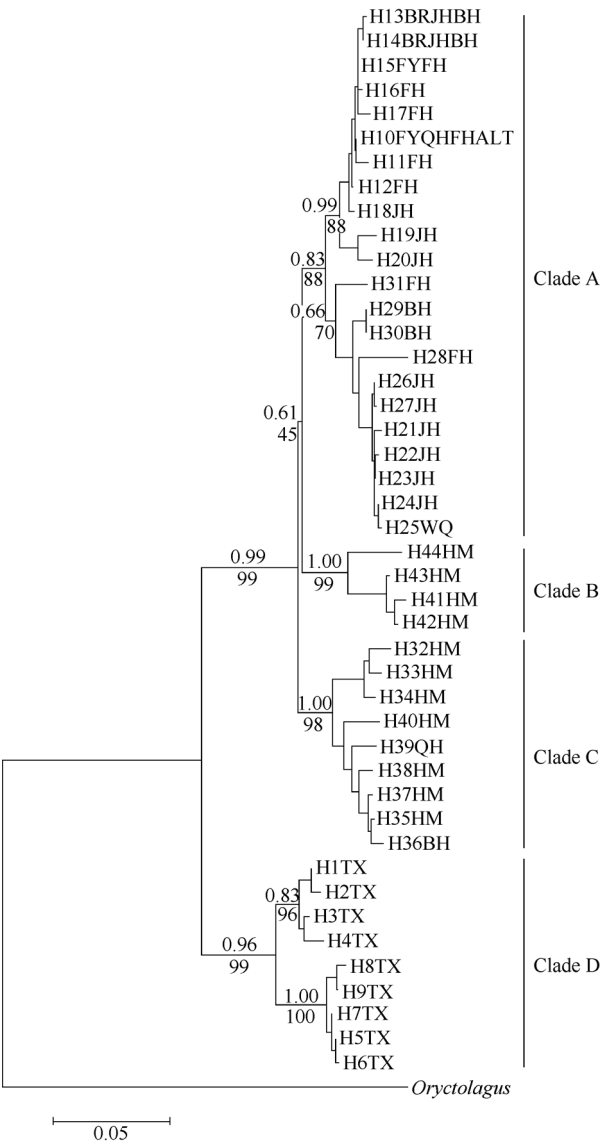


图 3 基于新疆草兔 mtDNA 控制区 44 个单倍型的序列构建的贝叶斯树

Fig. 3 Bayesian inference tree of 44 mtDNA haplotypes based on mtDNA control region fragment of Cape hare in Xinjiang

NJ 树与贝叶斯树的拓扑结构相同; 进化枝上和枝下的数字分别代表贝叶斯树的后验概率和 NJ 树的支持率。

Neighbour-joining tree obtained the same topology with Bayesian tree. Numbers above the branches are Bayesian posterior probabilities and those below the branches are the bootstrap proportions derived from a Neighbour-joining tree.

表 5 新疆草兔 4 个进化枝的系群的遗传分化指数及遗传距离

Tab. 5 F_{ST} (below the diagonal) and genetic distance (above the diagonal) between 4 clades of Cape hare in Xinjiang				
	Clade A	Clade B	Clade C	Clade D
Clade A		0.070	0.065	0.130
Clade B	0.690*		0.077	0.141
Clade C	0.604*	0.647*		0.134
Clade D	0.837*	0.831*	0.790*	

* $P<0.01$.

的单倍型都来自南部群体, 且与其他进化枝间的突变步数高达 71 步。来自北部和西部群体的单倍型主要分布在 Clade A 中。来自东部群体的单倍型被分为了两个关系较远的进化枝(Clade B 和 Clade C)。从图中还可以看出, 来自新疆西部、北部、中部及东部地区的草兔并没有共享单倍型, 所有单倍型均为该地区的独有单倍型。

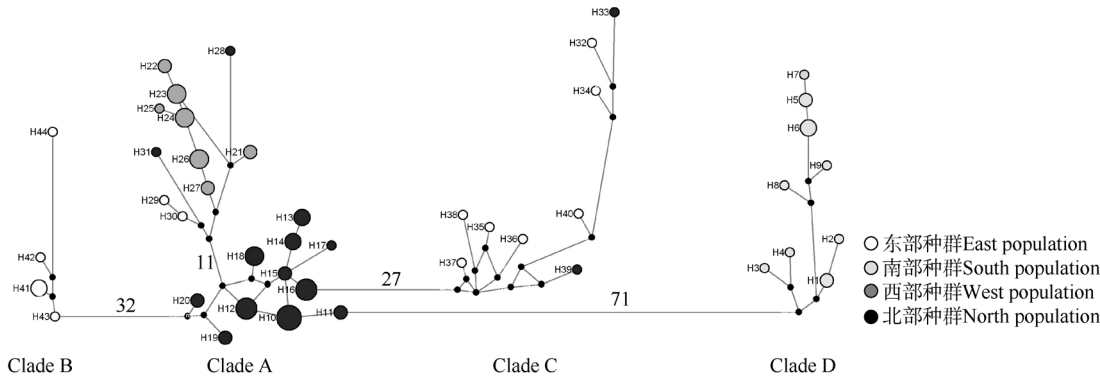


图 4 新疆草兔 mtDNA 控制区 44 个单倍型的中介网络图

Fig. 4 Median-joining network for 44 mtDNA control region haplotypes of *Lepus capensis*

圆圈的面积与单倍型频率成比例, 粗体数字代表突变步数 (仅显示了主要的突变步骤)。

The area of the circle is proportional to the haplotype frequency. The bold numbers in network represent mutational steps (only primary mutational steps are shown).

3 讨论

3.1 遗传多样性

相比于其他它已报道的兔属物种, 如欧兔(*L. europaeus*) $h=0.988\pm0.004$, $\pi=0.027\pm0.003$; 地中海草兔 (*L.c. mediterraneus*) $h=0.870\pm0.042$, $\pi=0.014\pm0.008$; 雪兔 (*L. timidus*) $h=0.977\pm0.027$, $\pi=0.057\pm0.029$ (Massimo et al, 2003); 塔里木兔 $h=0.984\pm0.004$, $\pi=0.045\pm0.022$ (Li et al, 2006)。本研究检测到新疆草兔具有较高的遗传多样性($h=0.977\pm0.005$, $\pi=0.064\pm0.031$)。新疆草兔种群较高的遗传多样性可能是由于其存在一个相当大的有效种群(Su et al, 2001), 或野外种群数量较大, 其庞大的种群数量能有效地保存群体内的遗传变异。同时, 新疆草兔复杂多样的生存环境也会促进其群体分化。新疆草兔群体的 Tajima's D 和 Fu's F_s 的中性检验并不显著 (分别为 -1.914 和 1.466 , $P>0.05$, 见表 2)。核苷酸错配分析显示多峰分布(图未显示), 这主要是由新疆草兔群体存在较为明显的遗传分化而致(系统发育分析显示存在 4 个分化明显的进化枝), 在一些家养动物的群体研究中也发现了类似的现象(He et al, 2008)。另外, 第四纪冰期对于兔属物种

的形成、扩散和遗传结构也产生了重大的影响(Avise et al, 1998; Hewitt, 1996; Shi et al, 2006)。

3.2 遗传结构

地理隔离是群体间基因交流的天然屏障, 是影响群体间遗传分化的重要因素。Wright 的距离隔离(isolation by distance)理论认为, 自然界存在着距离隔离现象, 即物种遗传分化的程度会随着地理距离的增加而增加(Wright, 1943), 许多研究也证实了这一理论(Floyd et al, 2005; Trizio et al, 2005)。

我们在分析新疆草兔的系统地理结构时, 并没有按照形态分类上的亚种分布地来划分草兔群体, 而是根据新疆的地形和地理距离划分为东西南北 4 个种群, 目的是为了检测地理隔离和距离隔离对新疆草兔群体遗传结构产生的影响。本研究中, 从新疆草兔 4 种群的 F_{ST} 值和基因流(表 4)可以看出, F_{ST} 值都在 0.436 以上, 且 $P<0.01$, 可见, 新疆草兔各种群之间均产生了十分显著的分化; 种群间 N_m 值都小于 1, 表明其基因交流非常有限。本文对新疆北部、西部、东部和南部 4 个地理种群的草兔样品的分析, 共发现 44 个单倍型, 各种群的单倍型多样性都很高, 且各种群间并没有共享单倍型, 也表明新疆草兔种群间已经发生明显的遗传分化。

Mantel tests 分析表明, 新疆草兔的遗传距离与空间地理距离之间具有显著正相关性, 地理距离越远, 遗传距离越大。我们的研究还发现, 系统树(图 3)与网络图(图 4)中, 来自相同或相邻地区的草兔聚为一枝, 显示新疆草兔群体存在较显著的系统地理结构。AMOVA 分析显示, 新疆草兔地理群体间的变异明显大于群体内的变异(两种分析方法分别为 58.91% 和 68.45%, 均占 50% 以上, 表 3), 该结果同样说明新疆草兔存在明显的地理分化。结合 4 个地理群体的地理分布来看, 天山山脉和塔克拉玛干沙漠及其广阔的距离将南部种群与其他种群分隔开来; 东部种群与北、西部种群间也有沙漠和山脉的隔离, 因而这些种群之间的基因交流十分困难, 进而导致新疆草兔不同地理群体间显著的遗传分化。这更进一步确认了山脉和沙漠的隔离对新疆草兔群体分化有重要的影响作用。

另外, 由中介网络图可以看出(图 4), Clade A 中的单倍型主要来自西部群体和北部群体, 但是有两个单倍型(H29 和 H30)却是来自东部群体。同样, Clade C 中的单倍型主要来自东部群体, 但是单倍型 H33 和 H39 却是来自北部群体。这说明 4 个地理种群之间的地理隔离并不完全, 它们之间还存在有限的基因流。

综上所述, 新疆草兔各地理群体之间已发生明显的遗传分化, 这种分化是由于地理隔离和距离隔离造成的。但是, 各地理群体之间还存在有限的基因流。

3.3 亚种分化

传统意义上的亚种是指某个种的表型上相似的种群的集群, 栖息在该物种分布范围内的次级地理区, 而且在分类学上和该种的其他种群不同。也就是说亚种是在一定的分布区域内具有特定表型特征的同种个体的集群(Mayr & Ashlock, 1991)。传统意义上的亚种在生物多样性保护中已经被当做独立的保护单元进行保护(O'Brien & Mayr, 1991), 但是生物多样性保护更多的是为了保护遗传多样性, 所以一个有效的保护单元在分子水平上也应该是一个独立的进化单元, 针对这样的保护单元制定的保护策略才能真正地保护生物的遗传多样性。在对非洲野狗(*Lycaon pictus*)(Girman et al, 2001)、虎(*Panthera tigris*)(Luo et al, 2004; Luo et al, 2006)、林蛙(*Rana altaica*)(Yang et al, 2010)以及马属动物(*Equus*)(Krüger et al, 2005)的亚种研究中, 亚种在

基于遗传距离构建的系统树中都以单系出现。但是也有很多传统意义上的亚种在分子水平上并没有形成一个独立进化单元(Barrowclough, 1980; Mayr & Ashlock, 1991; O'Brien & Mayr, 1991; Ball & Avise, 1992; Burbrink et al, 2000; Fischer et al, 2006)。而且, 一些由形态和地理区域划分的“亚种”与分子水平上的结果并不一致, 如水蛇(*Nerodia erythrogaster*)和黑马羚(*Hippotragus niger*)(Robert et al, 2010; Alpers et al, 2004); 或被认为是不同的种, 如王蛇(*Lampropeltis getula*)和壁虎(*Phelsuma*)(Pyrone & Burbrink, 2009; Raxworthy et al, 2007)。本研究基于新疆草兔 mtDNA 控制区以邻接法和贝叶斯两种方法构建的分子系统树将新疆草兔分为支持率较高的 4 个独立进化枝。这 4 个进化枝与根据传统形态学定义的新疆 3 个草兔亚种并没有一一对应, 其中 Clade A 主要包含来自新疆北部和西部群体样品(西域亚种), Clade B 和 Clade C 的样品来自东部种群(中亚亚种), Clade D 中的样品全部来自南部种群(帕米尔亚种)。在形态分类学中, 新疆西部精河、温泉的草兔与北部青河、福海、富蕴、哈巴河、布尔津、阿勒泰的草兔同属于草兔西域亚种, 在本文的进化树中也是聚为一枝(Clade A)。因此, 我们的结果从分子角度支持传统形态分类上的草兔西域亚种的分类地位。新疆东部种群的草兔样品分聚为支持率很高的两个进化枝(Clade B 和 Clade C), 提示来自新疆东部的草兔可能存在两个亚种, 而不是形态分类中的中亚亚种这一个亚种。对于形态分类中的草兔帕米尔亚种, 在我们的进化树上也形成了一个独立的进化枝(Clade D), 由于其与新疆其它草兔亚种地理距离较远, 生境为海拔较高地区, 提示其可能达到种的分化水平。

除在系统树上形成单系外, 物种内种群的分化是否已达到亚种水平还要看各进化枝之间的遗传分化是否显著(Yan et al, 2009)。我们对新疆草兔进化树上的 4 个独立枝计算了其 F_{ST} 值(表 5), 各枝系群分化十分显著($P < 0.01$); 图 4 显示了 Clade A~D 之间具有较多的突变步数(27~71 步), 另外, 对 4 进化枝间的遗传距离的计算显示(表 5): Clade A、B 和 C 间的遗传距离在 6.5%~7% 之间, Clade D 与其他枝系群间遗传距离最大, 均在 13% 以上。已报道的基于 D-loop 区的中国 9 种野兔种间的遗传距离为 9.4%~16.4% (Wu et al, 2005), 雪兔和欧兔的序列差异为 12%~14.6%, 雪兔群体内部的序列差异为

(0%~7.6%)(Thulin et al, 1997)。可见 Clade A、B 和 C 间的遗传分化处于亚种水平, 但是 Clade D 与其他枝系间的分化可能已经达到了种间的分化水平。

来自新疆中部地区焉耆和博湖的草兔, 其分类地位一直未澄清。Luo(1988)将其与东疆哈密草兔划分为中亚亚种, 而 Wang(2003)则将其与新疆西北部广大地区的草兔划归为哈萨克亚种(罗泽珣称为西域亚种), 本研究包含 3 个博湖的草兔样本, 划分为 3 个单倍型, 其中一个单倍型与来自东疆哈密的

单倍型聚为一枝; 另两个与新疆西北部广大地区的草兔聚为一枝。因此, 焉耆和博湖可能是中亚亚种和西域亚种的过渡地带, 来自这两个亚种的样品在这个地区都有分布。

综上所述, 本研究的结果支持形态分类上草兔西域亚种的分类地位, 但中亚亚种被分为两个独立的进化枝, 提示可能存在两个亚种; 帕米尔亚种(*L. c. pamirensis*)与其他亚种间的遗传距离在 13% 以上, 提示其可能已达到种的分化水平。

参考文献:

- Alpers DL, Vuuren BJ, Van AP, Robinson TJ. 2004. Population genetics of the roan antelope (*Hippotragus equinus*) with suggestions for conservation [J]. *Mol Ecol*, **13**: 1771-1784.
- Andrew TS, Yan X. 2008. Mammal of China [M]. New Jersey: Princeton University Press.
- Avise JC. 1992. Molecular population structure and the biogeographic history of a regional fauna: A case history with lessons for conservation biology [J]. *Oikos*, **63**: 62-76.
- Avise JC, Walker D, Johns GC. 1998. Speciation durations and pleistocene effects on vertebrate phylogeography [J]. *Proc R Soc Lond B*, **265**: 1702-1712.
- Ball RM, Avise JC. 1992. Mitochondrial DNA phylogeographic differentiation among avian populations and the evolutionary significance of subspecies [J]. *Auk*, **109**: 626-636.
- Bandelt HJ, Forster P, Rohl A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies [J]. *Mol Biol Evol*, **16**: 37-48.
- Barrowclough GF. 1980. Genetic and phenotypic differentiation in a wood warbler (genus *Dendroica*) hybrid zone [J]. *Auk*, **97**: 655-668.
- Burbrink FT, Lawson R, Slowinski JB. 2000. Mitochondrial DNA phylogeography of the polytypic North American rat snake (*Elaphe obsoleta*): a critique of the subspecies concept [J]. *Evolution*, **54**: 2107-2118.
- Chapman JA, Flux JEC. 2008. Introduction to the Lagomorpha [M]//Alves PC, Ferrand N, Hacklender K. Lagomorph Biology: Evolution Ecology and Conservation. Berlin: Springer, 1-12.
- Conrad AM, Matthee, Bettine JV. 2004. A molecular supermatrix of the rabbits and hares (Leporidae) allows for the identification of five intercontinental exchanges during the miocene [J]. *Syst Biol*, **53**(3): 433-447.
- Excoffier L, Smouse PE, Quattiro JM. 1992. Analysis of molecular variance from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data [J]. *Genetics*, **131**: 479-491.
- Excoffier LG, Laval SS. 2005. Arlequin ver.3.0: An integrated software package for population genetics data analysis [J]. *Evol Bioinform*, 47-50.
- Fischer A, Pollack J, Thalmann O, Nickel B, Pääbo S. 2006. Demographic history and genetic differentiation in Apes [J]. *Curr Biol*, **16**: 1133-1138.
- Floyd CH, Van Vuren DH, May B. 2005. Marmots on great basin mountaintops: using genetics to test a biogeographic paradigm [J]. *Ecology*, **86**(8): 2145-2153.
- Flux JEC, Angermann R. 1990. The Hares and Jackrabbits [M]//Chapman JA, Flux JEC. Rabbits, Hares and Picas. Glaucl: Lagomorph Specialist Group.
- Fu YX. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitching and background selection [J]. *Genetics*, **147**: 915-925.
- Girman DJ, Vilà C, Geffen E, Creel S, Mills MGL, McNutt JW, Ginsberg J, Kat PW, Mamiya KH, Wayne RK. 2001. Patterns of population subdivision, gene flow and genetic variability in the African wild dog (*Lycan pictus*) [J]. *Mol Ecol*, **10**: 1703-1723.
- Gissi C, Gullberg A, Arnason U. 1998. The complete mitochondrial DNA sequence of the rabbit, *Oryctolagus cuniculus* [J]. *Genomics*, **50**: 161-169.
- He DQ, Zhu Q, Chen SY, Wang HY, Liu YP, Yao YG. 2008. A homogenous nature of native Chinese duck matrilineal pool [J]. *BMC Evol Biol*, **8**: 298.
- Hewitt GM. 1996. Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation [J]. *Biol J Linn Soc*, **58**: 247-261.
- Hichem BS, Franz S, Costas S. 2008. Population genetics of cape and brown hares (*Lepus capensis* and *L. europaeus*): A test of Petter's hypothesis of conspecificity [J]. *Biochem Syst Ecol*, **36**: 22-39.
- Hoffmann RS, Smith AW. 2005. Order Lagomorpha [M]//Wilson DE, Reeder DM. Mammal Species of the World. A Taxonomic and Geographic Reference; Vol 1. 3rd ed. Washington: Smithsonian Institution Press, 185-211.
- Huelsenbeck JP, Ronquist F. 2001. MrBayes, Bayesian inference of phylogenetic trees [J]. *Bioinformatics*, **17**: 753-755.
- Krütger K, Gaillard C, Stranzinger G, Rieder S. 2005. Phylogenetic analysis and species allocation of individual equids using microsatellite data [J]. *J Anim Breed Genet*, **122**: 78-86.
- Leaché AD, Reeder TW. 2002. Molecular systematics of the Eastern Fence lizard (*Sceloporus undulatus*): A comparison of parsimony, likelihood, and bayesian approaches [J]. *Syst Biol*, **51**: 44-68.
- Li ZC, Xia L, Li YM, Yang QS, Liang MY. 2006. Mitochondrial DNA variation and population structure of the Yarkand hare *Lepus yarkandensis* [J]. *Acta Theriol*, **51**: 243-253.
- Luo SJ, Kim JH, Johnson WE, Walt J, Martenson J, Yuhki N, Miquelle DG, Uphyrkina O, Goodrich JM, Quigley HB. 2004. Phylogeography and genetic ancestry of tigers *Panthera tigris* [J]. *PLoS Biol*, **2** (12): 2275-2293.
- Luo SJ, Kim J, Warren EJ, Dale GM, Huang SQ, Pan WS, James LDS, Stephen JOB. 2006. Proceedings in phylogeography and genetic ancestry of tigers (*Panthera tigris*) in China and across their range [J]. *Zool Res*, **27**(4): 441-448. [罗述金, Jae-heup Kim, Warren E Johnson, Dale G Miquelle, 黄世强, 潘文石, James LD Smith, Stephen J O' Brien. 2006. 中国及其他分布区域野生虎的系统地理学和遗传起源研究进展. 动物学研究, **27**(4): 441-448.]
- Luo ZX. 1988. The Chinese Hare [M]. Beijing: China Forestry Publishing

- House. [罗泽珣. 1988. 中国野兔. 北京: 中国林业出版社.]
- Massimo P, Francesco R, Valter T, Ettore R. 2003. Hare populations in Europe: intra and interspecific analysis of mtDNA variation [J]. *C R Biol*, **326**: 80-84.
- Mayr E, Ashlock PD. 1991. Principles of Systematic Biology [M]. New York: McGraw-Hill.
- O'Brien SJ, Mayr E. 1991. Bureaucratic mischief: recognizing endangered species and subspecies [J]. *Science*, **251**: 1187-1188.
- Peakall R, Smouse PE. 2007. GENALEX 6: Genetic analysis in excel. population genetic software for teaching and research [J]. *Mol Ecol Notes*, **6**: 288-295.
- Posada D, Crandall KA. 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution [J]. *Bioinformatics*, **14**: 817-818.
- Pyron RA, Burbrink FT. 2009. Systematics of the common kingsnake (*Lampropeltis getula*; Serpentes: Colubridae) and the burden of heritage in taxonomy [J]. *Zootaxa*, **2241**: 22-32.
- Raxworthy C, Ingram C, Rabibisoa N, Pearson R. 2007. Applications of ecological niche modeling for species delimitation: A review and empirical evaluation using day geckos (*Phelsuma*) from Madagascar [J]. *Syst Biol*, **56**: 907-923.
- Robert M, John CMJ, John MV, Paul TC, Leslie JR. 2010. Phylogeographic analysis and environmental niche modeling of the plain-bellied watersnake (*Nerodia erythrogaster*) reveals low levels of genetic and ecological differentiation [J]. *Mol Phylogenet Evol*, **55**: 985-995.
- Ronquist F, Huelsenbeck JP. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models [J]. *Bioinformatics*, **19**: 1572-1574.
- Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees [J]. *Mol Biol Evol*, **4**: 406-425.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. Molecular Cloning, a Laboratory Manual [M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Shi YF, Cui JZ, Su Z. 2006. The Quaternary Glaciations and Environmental Variations in China [M]. Hebei: Hebei Science and Technology Publishing House.
- Su B, Fu YX, Wang YX, Chakraborty R. 2001. Genetic diversity and population history of the red panda (*Ailurus fulgens*) as inferred from mitochondrial DNA sequence variations [J]. *Mol Biol Evol*, **18** (6): 1070-1076.
- Tajima F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism [J]. *Genetics*, **123**: 584-595.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. 2007. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0 [J]. *Mol Biol Evol*, **4**: 1596-1599.
- Thulin CG, Jaarola M, Tegelstrom H. 1997. The occurrence of mountain hare mitochondrial DNA in wild brown hares [J]. *Mol Ecol*, **6**, 463-467.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. 1997. The clustalx windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. *Nucleic Acids Res*, **24**: 4876-4882.
- Trizio I, Crestanello B, Galbusera P. 2005. Geographical distance and physical barriers shape the genetic structure of Eurasian red squirrels (*Sciurus vulgaris*) [J]. *Mol Ecol*, **14** (2): 469-481.
- Van HWF, Groen AF, Prins HHT. 2002. Phylogeography of the African buffalo based on mitochondrial and Y-chromosomal loci: Pleistocene origin and population expansion of the Cape buffalo subspecies [J]. *Mol Ecol*, **11**: 267-279.
- Wang YX. 2003. A Complete Checklist of Mammal Species and Subspecies in China-A Taxonomic and Geographic Reference [M]. Beijing: China Forestry Publishing House. [王应祥. 中国哺乳动物种和亚种分类名录与分布大全[M].北京: 中国林业出版社, 2003.]
- Wright S. 1943. Isolation by distance [J]. *Genetics*, **28**: 114-138.
- Wu CH, Wu JP, Thomas D, Bunch D, Li QW, Wan YX, Zhang YP. 2005. Molecular phylogenetics and biogeography of *Lepus* in Eastern Asia based on mitochondrial DNA sequences [J]. *Mol Phylogenet Evol*, **37**: 45-61.
- Yan XL, Tang WQ, Yang JQ. 2009. Population genetic structure of tapertail anchovy (*Coilia mystus*) in coastal waters of southeast China based on mtDNA control region sequences [J]. *Biodiver Sci*, **17** (2): 143-150. [阎雪岚, 唐文乔, 杨金权. 2009. 基于线粒体控制区的序列变异分析中国东南部沿海凤鲚种群遗传结构. 生物多样性, **17** (2): 143-150.]
- Yang B, Chen XY, Yang JX. 2008. Structure of the mitochondrial DNA control region and population genetic diversity analysis of *Anabarilius grahami* (Regan) [J]. *Zool Res*, **29**(4): 379-385. [杨博, 陈小勇, 杨君兴. 2008. 白鱼线粒体DNA控制区结构和种群遗传多样性分析. 动物学研究, **29**(4): 379-385.]
- Yang JX, Zhou WW, Rao DQ, Poyarkov AN, Kuzmin SL, Che J. 2010. Validity and systematic position of *Rana altaica* (*Rana*: Ranidae): Results of a phylogenetic analysis [J]. *Zool Res*, **31**(4): 353-360. [杨军校, 周炜炜, 饶定齐, POYARKOV A Nikolay, KUZMIN Sergius L, 车静. 2010. 阿尔泰林蛙的物种有效性及其分类地位——来自系统发育分析的证据. 动物学研究, **31**(4): 353-360.]