

# 雪豹线粒体 DNA (mtDNA) 研究 及其分类地位的探讨\*

于 宁 郑昌琳

(中国科学院西北高原生物研究所, 西宁, 810001)

王行亮 何光昕 张志和 张安居 吕文其 唐 飞

(成都动物园)

## 摘 要

本文构建了雪豹和金钱豹的限制性内切酶图谱。通过限制性酶谱的比较, 探讨雪豹的属级分类地位。结果表明, 两物种的 mtDNA 基因组明显趋异, 其遗传距离为 0.075 33, 但这种差异根据文献记载, 似乎未到属级分化程度, 故认为雪豹不应单立为属, 而是豹属的一员。但鉴于雪豹在形态、行为、核型和 mtDNA 等方面, 不同于豹属其他种类, 我们认为雪豹应视豹属中的一个有效亚属。

关键词 豹属; 雪豹; 金钱豹; 线粒体 DNA; 限制性内切酶图谱

金钱豹和雪豹被 Linnaeus (1758) 和 Schreber (1775) 先后命名为 *Felis pardus* 和 *Felis uncia*, 已有二个多世纪。继后 Oken (1816) 和 Gray (1854) 分别定名豹属 (*Panthera*) 和雪豹属 (*Uncia*), 并指定各自的模式种为金钱豹和雪豹 (type species: *Felis pardus* and *Felis uncia*)。尽管如此, 一个多世纪以来, 兽类系统学者对于雪豹属的分类地位仍有争议, 但国内外学者多数赞同把雪豹作为豹属物种。近年来, 随着分子生物学的飞速发展, 许多先进的技术已成为动物系统学, 保护生物学等学科研究的先进手段, 使动物系统学家从分子水平上解决了不少系统学中悬而未决的疑难问题。动物线粒体 DNA 因其具有分子量小, 呈母系遗传方式, 无组织特异性及基因组结构高度保守等特点, 已成为探讨动物种间亲缘关系, 母系遗传的有用遗传标记。鉴此, 本文试图从 mtDNA 限制性内切酶图谱研究两种豹的分子性状及亲缘关系, 进而对雪豹的分类地位再作补充及评述, 并为动物系统与进化等方面, 提供进一步的资料。

## 材料和方法

1. 实验动物 雪豹 1 只 (♂), 产于青海玉树, 金钱豹 2 只 (♂♂), 成都动物园繁育的后代, 均取其新鲜肝脏组织速冻保存备用。

2. 试剂 10 种六碱基识别序列的限制性内切酶,  $\lambda$ DNA/Hind III 分子量标记和 RNase I 均购自华美公司, 其他试剂为国产分析纯。

3. mtDNA 的提取与限制性内切酶的消化 mtDNA 的提取与纯化按改进的碱变性

\* 本工作在中国科学院昆明动物研究所细胞与分子进化开放研究实验室完成, 该项目由成都大熊猫繁育研究基金会及成都市城市建设委员会共同资助, 一并致谢

本文于 1995 年 9 月 11 日收到, 1996 年 2 月 1 日收到修改稿

法进行(王文等, 1993)。纯化的 mtDNA 样品用 Ava I、BamH I、Pst I、Bgl II、Cla I、EcoR I、EcoR V、Hind III、Hpa I 和 Sca I 等 10 种限制性内切酶酶切, 酶切反应采用厂家提供的缓冲液和使用方法。酶切后的样品以 0.8% 的琼脂糖凝胶(含 0.05  $\mu\text{g}/\text{ml}$  溴化乙锭)电泳分离。电极缓冲液为 Tris-硼酸 (PH8.3) 系统。分离后的样品, 在 254 nm 紫外光照射下观察拍照。

4. 数据处理 用双酶切法构建限制性内切酶图谱。根据 mtDNA 限制性位点的差异, 用 Nei 等 (1979) 的公式计算物种间的遗传距离。

$$F = 2N_{xy} / (N_x + N_y) \quad P = -\ln(F) / r$$

其中  $N_{xy}$  是 x、y 两物种间共有的酶切位点数,  $N_x$  和  $N_y$  分别为物种 x 和 y 的位点总数。F 为物种间的限制性片段共享度。P 为物种间的遗传距离, r 为酶的识别位点数。

## 结 果

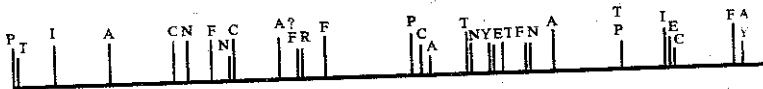
用 10 种识别六碱基序列的限制性内切酶分别消化雪豹和金钱豹的各个样品, 共检测出 19 种限制性类型, 除 EcoR V 外, 其余 9 种酶切结果呈现出多态(图版 I, 表 1)。测得它们线粒体 DNA 分子量大小为均 16.5 kb 左右。

表 1 雪豹和金钱豹 mtDNA 限制性类型片段大小 (kb)  
Table 1 Fragment sizes of mtDNA digested with ten restriction endonucleases for *Panthera uncia* and *P. pardus*

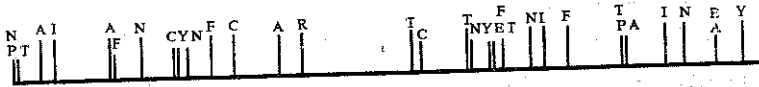
酶 Enzymes	雪豹 <i>Panthera uncia</i>					金钱豹 <i>Panthera pardus</i>					
Ava I	7.6	3.7	2.0	1.7	1.5	3.9	3.7	3.3	2.9	2.7	
BamH I	10.7	3.4	2.4			13.1	3.4				
Bgl II	6.8	5.3	4.5			11.2	5.3				
Cla I	11.1	4.1	1.3			5.8	5.3	4.1	1.3		
EcoR I	11.9	4.6				12.9	3.6				
EcoR V	16.5					16.5					
Hind III	6.2	3.0	2.8	2.2	1.3	0.9	9.0	5.3	1.3	0.9	
Hpa I	8.6	3.3	2.6	1.2	0.8		9.8	3.3	2.6	0.8	
Pst I	13.3	3.2					8.7	4.6	3.2		
Sca I	6.6	6.2	2.1	1.6			5.3	4.4	4.3	1.9	0.6

10 种酶共检测出 32~34 个位点, 相当于 192~204 个碱基对或占整个 mtDNA 分子的 1.16%~1.24%。用双酶切法对总共 45 个位点均作了酶谱定位, 综合 10 种酶的酶切类型, 从两种豹的 3 只个体中共检测到两类 mtDNA 单倍型, 分别对应于两个物种。

*Panthera pardus*



*Panthera uncia*



[1 kb]

图 1 雪豹与金钱豹限制性内切酶图谱, A=Ava I; I=BamH I; Y=Bgl II;

C=Cla I; E=EcoR I; R=EcoR V; N=Hind III; I=Hpa I; P=Pst I; F=Sca I

Fig. 1 Restriction maps of mtDNA for *P. uncia* and *P. pardus* A=Ava I; I=BamH I; Y=Bgl II;

C=Cla I; E=EcoR I; R=EcoR V; N=Hind III; I=Hpa I; P=Pst I; F=Sca I

## 讨 论

1. 由表 1 及图 1 可见, 雪豹与金钱豹在 mtDNA 限制性片段及位点方面, 均存在显著差异。所用 10 种限制性内切酶有 9 种酶切结果呈现出多态, 两者之间不同位点共有 24 个, 占位点总数的 53.3%。从而, 雪豹与金钱豹的区别, 在核外基因组方面得到进一步的证实。

2. 雪豹是归入豹属, 还是自成一属? 各学者之间未能得到满意的共识。Gray (1854) 首先将雪豹列为独立属, 继后, Pocock (1917, 1930) 修订猫科动物时, 将大型猫类立为豹亚科 (subfamily Pantherinae) 下设豹和雪豹二属, 此属级系统 (分类) 地位得到一些学者的承认 (Hemmer, 1972; Wilson 等, 1993)。依据前人的观察, 雪豹的舌骨基本骨化, 脑颅前的眶间区特别隆凸; 鼻端被毛超过鼻孔而不裸露; 趾间与掌垫均具浓密粗毛; 不能大声吼叫, 只能嘶嚎; 进食姿态为蹲着用前脚抓住食物等均有别于豹属动物。特别是在饲养条件下, 雪豹与虎、豹很难杂交, 没有产生过杂交后代, 而狮、虎、豹和美洲豹之间均能进行杂交, 并有杂交后代的记录, 故亦提议“单列为一个属较为适宜”(高耀亭等, 1987)。

尽管如此, 大多数学者认为雪豹在体型, 头骨、牙齿和骨骼结构上与豹属种类相似, 应并入豹属 (Simpson, 1945; Ellerman 等, 1966; Corbet, 1978; Honacki 等, 1982; Corbet 等, 1991)。

我们的研究表明, 雪豹和金钱豹的 mtDNA 经 10 种限制性内切酶消化后, 共检测出 24 个不同位点, 占总位点数之 53.3%, 它们之间的遗传距离为 0.07533。虽然, 表明它们种间的核外基因组明显趋异。但是, 根据 Masuda 等 (1994) 对鼬科 (Mustelidae) 的研究表明这种趋异并未达属级分化程度。Masuda 等 (1994) 另一篇对几种猫科动物 12s rRNA 基因的序列分析表明, 雪豹与金钱豹的亲缘关系比虎与金钱豹的亲缘关系近, 且分子系统树的分支置信度值高达 97%。再根据核型资料, 金钱豹、虎和雪豹 3 种动物的核型非常相似, 均为  $2N=38$ , 前 2 种常染色体为  $32(M+SM+ST)+4(A+T)$ , 雪豹的常染色体为  $32(M+SM)+4(A)$ , 性染色体 X 三种均为 SM 染色体, 金钱豹的 Y 染色体为 ST, 虎和雪豹的 Y 染色体为 SM (陈宜峰等, 1986)。因此, 12s rRNA 基因的序列分析和细胞学的核型等资料, 均表明单立雪豹属欠妥。根据我们研究的结果, 参考上述相关的文献, 故认为雪豹应为豹属的一员, 且作为一个亚属比较适宜, 这是对 Simpson (1945) 观点的支持与补充。

## 参 考 文 献

- 王文, 施立明 1993 一种改进的动物线粒体 DNA 提取方法。动物学研究, 14 (2): 197~198
- 陈宜峰, 郭建民. 1986. 哺乳动物染色体 北京: 科学出版社, 166~167.
- 高耀亭, 周嘉禧 1987. 中国动物志 兽纲第八卷, 食肉目 北京: 科学出版社. 309~363.
- Corbet G B. 1978. The mammals of the Palearctic region: a taxonomic review. Brit Mus (Nat Hist), London, pp185.
- Corbet G B, Hill J E 1991. A world list of mammalian species. Third ed. Brit Mus (Nat Hist) publications, London, pp114.
- Ellerman J R, Morrison-Scott I C S 1966 Checklist of Palearctic and Indian mammals 1758 to 1946 second ed Brit Mus (Nat Hist), London. pp320.
- Gray J E. 1854. The ounces. Ann Mag Nat Hist, Ser. 2. 14: 394.
- Hemmer H. 1972 *Uncia uncia* Mammalian species, 20: 4~5.
- Honacki J H, Kinman K E, Koepl J W (eds) 1982 Mammal species of the world: A taxonomic and geographic reference. Allen Press, Inc, and the Association of Systematics Collections, Lawrence, Kansas, pp 282~283

- Masuda R, Yoshida M C. 1994. A molecular phylogeny of the family Mustelidae (Mammalia Carnivora), based on comparison of mitochondrial cytochrome b nucleotide sequences. *Zool Sci*, 11: 605~612.
- Masuda R, Yoshida M C, Shinyashiki F, Bando G. 1994. Molecular phylogenetic status of the Iriomote cat *Felis iriomotensis*, inferred from mitochondrial DNA sequence analysis. *Zool Sci*, 11: 597~604.
- Nei M, Li W H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 76: 5269~5273.
- Oken L. 1816. *Lehrbuch der Naturgeschichte*. Zoologie. August Schmid und Comp, Jana 3, 2: 1052.
- Pocock R I. 1917. The classification of the existing Felidae. *Ann Mag Nat Hist*. ser 8, 20: 329~350.
- Pocock R I. 1930. The Panthers and ounces of Asia. Part II The panthers of Kashmir, India, and Ceylon. *J Bom Nat Hist Soc*, 34 (2): 307~336.
- Simpson G G. 1945. The principles of classification and a classification of mammals. *Bull Amer Mus Nat Hist*. vol 85, pp120. 231.
- Wilson D E, Reeder D M. 1993. *Mammal species of the world: A taxonomic and geographic reference*. second ed, pp298~299. Smithsonian Institution Press, Washington and London.

## A REVISION OF GENUS *UNCIA* GRAY, 1854 BASED ON MITOCHONDRIAL DNA RESTRICTION SITE MAPS

YU Ning      ZHENG Changlin

(Northwest Plateau Institute of Biology, Academia Sinica, Xining, 810001)

WANG Xingliang   HE Guangxin   ZHANG Zhihe

ZHANG Anju   LU Wenqi   TANG Fei

(Chengdu Zoo)

### Abstract

The Snow leopard (*Panthera uncia*) is one of the most threatened wild big cats within its range of distribution, however, the question of its systematic status is a matter of debate. Is it a member of genus *Panthera*, or is it in its own genus (*Uncia*)? The analysis of genetic difference at the DNA level may provide useful data to clarify the issue. In the present study, ten hexanucleotide-specific restriction endonucleases were used to evaluate the patterns of mitochondrial DNA variation between the Snow leopard and leopard (*P. pardus*). The molecular size of mtDNA from the two species was about 16.5 kb. Ten enzymes surveyed 32~34 restriction sites, which corresponded to 192~204 base pairs, or 1.16%~1.24% of the total mtDNA molecule. A total of 45 restriction sites were mapped; of these sites, twenty-four, which correspond to 53.3% of the total sites, were variable. The sequence divergence between them was 0.07533, which was undoubtedly in the species-level distinction but did not reach the genus level. Therefore, the Snow leopard should be placed in the genus *Panthera* rather than in its own genus. It also seems reasonable to recognize *Uncia* as a valid subgenus. This conclusion not only support but also supplement the viewpoint of Simpson who treated *Uncia* as a subgenus within *Panthera*.

**Key word**    *Panthera*; Snow leopard (*Panthera uncia*); Leopard (*Panthera pardus*); Mitochondrial DNA (mtDNA); Restriction maps