



新疆布尔根河狸国家级自然保护区 狭耳鼠耳蝠线粒体基因组研究

阿斯姑丽·阿布都热合曼^{1,2,3}, 初雯雯^{4,5}, 戚英杰³, 初红军^{1,2*}, 吴红潘⁶, 何承斌⁷

1. 新疆大学生命科学与技术学院, 乌鲁木齐, 830046;
2. 新疆林科院森林生态研究所, 乌鲁木齐, 830002;
3. 新疆维吾尔自治区草原总站, 乌鲁木齐, 830049;
4. 北京林业大学生态与自然保护学院, 北京, 100083;
5. 新疆阿尔泰地区自然保护协会, 阿勒泰, 836500;
6. 汕头市濠江区农业农村局乡村振兴发展中心, 汕头, 515071;
7. 新疆布尔根河狸国家级自然保护区管理局, 阿勒泰, 836500

稿件运行过程

收稿日期: 2022-10-26

修回日期: 2023-02-01



关键词: 线粒体基因组;
狭耳鼠耳蝠;
濒危物种;
高通量测序;
系统发育

Key words: Mitochondrial genomes;
Myotis blythii;
Endangered species;
High throughput sequencing;
Phylogeny

中图分类号: Q953

文献标识码: A

文章编号:

2310-1490(2024)-01-0043-07

DOI: 10.12375/ysdwx.20240106

摘要

为提供鼠耳蝠属(*Myotis*)蝙蝠类遗传及进化分子水平的证据,通过高通量测序法对新疆布尔根河狸国家级自然保护区栖息的狭耳鼠耳蝠(*M. blythii*)线粒体基因组全序列进行测定和分析。结果显示:狭耳鼠耳蝠线粒体基因组总长为16 752 bp,总碱基组成为33.8%A、30.4%T、22.7%C和13.1%G;线粒体基因组由13个蛋白质编码基因、2个rRNA(12S和16S)基因、22个tRNA基因和1个非编码控制区组成;控制区基因长度为948 bp,比大鼠耳蝠(*M. myotis*)等姊妹物种短很多;与从NCBI下载的其他鼠耳蝠属蝙蝠线粒体基因组序列的系统发育分析比较,狭耳鼠耳蝠与大鼠耳蝠亲缘关系最近。研究结果丰富了鼠耳蝠属线粒体基因组信息,明确了新疆狭耳鼠耳蝠在鼠耳蝠属内的系统进化地位和亲缘关系,为蝙蝠科(Vespertilionidae)系统分子进化和后续研究提供基础数据。

基金项目: 科技部第三次新疆综合科学考察专项项目(2021xjkk1200, 2021xjkk1201); 国家林业和草原局科学技术司林草科技创新发展研究项目(2022132017); 新疆维吾尔自治区国际科技合作项目(20136026-2)

第一作者简介: 阿斯姑丽·阿布都热合曼(1994—), 女, 硕士研究生; 主要从事动物生态学和濒危物种保护生物学研究。E-mail: 1259188304@qq.com

*通信作者: 初红军, E-mail: hongjunchu@vip.163.com

Study on the Mitochondrial Genomes of *Myotis blythii* in the Buergen Beaver National Nature Reserve, Xinjiang

ABDURAHMAN Asimgul^{1,2,3}, CHU Wenwen^{4,5}, QI Yingjie³,
CHU Hongjun^{1,2*}, WU Hongpan⁶, HE Chengbin⁷

(1. College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi, 830046, China;

2. Xinjiang Academy of Forestry, Urumqi, 830002, China;

3. Grassland Station of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi, 830049, China;

4. College of Ecology and Nature Conservation, Beijing Forestry University, Beijing, 100083, China;

5. Nature Conservation Association of Altay Region, Altay, 836500, China;

6. Rural Revitalization Development Center, Agriculture and Rural Bureau, Shantou, 515071, China;

7. Management Bureau of Buergen Beaver National Nature Reserve, Altay, 836500, China)

Abstract: To provide molecular level evidence for the genetics and evolution of bats belonging to the genus *Myotis*, this study used high-throughput sequencing to determine and analyze the mitochondrial genome sequence of *M. blythii*, a species inhabiting at the Buergen Beaver National Nature Reserve of Xinjiang, China. Results showed that the total length of the mitochondrial genome of *M. blythii* was 16,752 bp, and the total base groups were 33.8% A, 30.4% T, 22.7% C, and 13.1% G. The mitochondrial genome consisted of 13 protein coding genes, 2 rRNAs (12S and 16S RNA) genes, 22 tRNA genes, and a noncoding control region. The length of the control region gene was 948 bp, which was much shorter than that of sister species such as *M. myotis*. Based upon mitochondrial genome sequences collected from NCBI for phylogenetic analysis of other bat species belonging to the genus *Myotis*, the analysis showed that *M. blythii* and *M. myotis* had the closest genetic relationship. The research findings of this study have enriched the mitochondrial genome information of this species, clarified the phylogenetic status and phylogenetic relationship of *M. blythii* in Xinjiang within the genus *Myotis*, and provided a data basis for the systematic and molecular evolution of Vespertilionidae and subsequent research.

全世界有蝙蝠18科202属1400余种^[1],分布在除两极以外的世界各地,中国有140余种^[2]。狭耳鼠耳蝠(*Myotis blythii*)是翼手目(Chiroptera)蝙蝠科(Vespertilionidae)鼠耳蝠属(*Myotis*)的一类小型蝙蝠,中国特有种,在我国分布于广西、陕西、新疆和内蒙古等地区^[3]。

新疆布尔根河狸国家级自然保护区(以下简称“布尔根河狸自然保护区”)是中国唯一有蒙新河狸(*Castor fiber birulai*)生存的地区,同时也是狭耳鼠耳蝠的栖息区,位于中蒙边境,保护区内河谷次生林年代久远且覆盖率高,处于天然状态,植物种类繁多且保存基本完好,具有典型的生态系统原始性和代表性,是不可多得的生物多样性基因库。随着分子技术的发展,国外研究人员运用D-loop、*COI*、*Cyt b*和*ND1*基因或核*RAG2*基因等对狭耳鼠耳蝠进行了研

究^[4-7],而由于地处偏远以及标本的稀缺性,国内对布尔根河狸自然保护区狭耳鼠耳蝠的研究并未涉及。因此,本研究测定了布尔根河狸自然保护区狭耳鼠耳蝠线粒体基因组全序列,并在线粒体基因组水平上对其系统发生关系进行探讨,结合已发表的9种鼠耳蝠属蝙蝠线粒体基因组序列评估了物种间系统发育关系,以期为该区域狭耳鼠耳蝠的系统发生学和进化研究提供数据资料。

1 材料与方法

1.1 样本采集

在布尔根河狸自然保护区内共采集28只狭耳鼠耳蝠。将捕获后的个体立即放入液氮中冷冻暂存,最终转移至实验室置于冰柜-80℃保存。

1.2 DNA提取和测序

以狭耳鼠耳蝠成年个体肌肉组织为试验样品,使用E. Z. N. A[®]Tissue DNA kit提取试剂盒(OMEGA)提取基因组DNA。待样品基因组DNA检测合格后,用超声波打断DNA并通过1%的琼脂糖凝胶电泳、割胶回收进行片段纯化,构建测序文库。委托上海元莘生物医药科技有限公司,由Illumina HiSeq平台进行质量检查和测序。用FastqStar v1.0软件统计原始数据碱基错误率和GC含量。

1.3 序列拼接和注释分析

使用Cutadapt v1.16分析软件对线粒体基因组DNA质量控制序列进行数据量统计。用FastQC

v0.11.4计算线粒体基因组DNA的A/T/G/C含量分布。使用拼接软件MitoZ (<https://github.com/linzhi2013/Mitoz>)对阅读片段的序列进行反复拼接,得到最优的拼接结果,并用MitoZ注释该线粒体基因组组成。使用MEGA 7.0软件计算线粒体基因组序列核苷酸组成比例。

1.4 系统发育分析

利用测得的狭耳鼠耳蝠线粒体基因组序列和GenBank中下载的9种鼠耳蝠属蝙蝠线粒体基因组序列(表1),以蝙蝠科的白腹管鼻蝠(*Murina leucogaster*)和赤蓬毛蝠(*Lasiurus borealis*)为外群,使用MEGA 7.0软件的NJ和ML构建鼠耳蝠属蝙蝠的系统发育树。

表1 GenBank 蝙蝠线粒体基因组序列信息

Tab. 1 The information about mitochondrial genomic sequences of bats acquired from GenBank

物种 Species	采样地 Sampling site	GenBank 登录号 GenBank accession number
狭耳鼠耳蝠 <i>Myotis blythii</i>	中国 (新疆)	MT588108
大鼠耳蝠 <i>Myotis myotis</i>	法国	KT901455
远东鼠耳蝠 <i>Myotis bombinus</i>	韩国	KT818621
大趾鼠耳蝠 <i>Myotis macrodactylus</i>	美国	KF440685
长尾鼠耳蝠 <i>Myotis frater</i>	美国	NC041638
金黄鼠耳蝠 <i>Myotis formosus</i>	韩国	HQ184048
巴氏鼠耳蝠 <i>Myotis bechsteinii</i>	德国	KX757757
布氏鼠耳蝠 <i>Myotis brandtii</i>	中国 (云南昆明)	KM199849
大卫鼠耳蝠 <i>Myotis davidii</i>	中国 (云南昆明)	KM233172
伊氏鼠耳蝠 <i>Myotis ikonnikovi</i>	韩国	KF111724
白腹管鼻蝠 <i>Murina leucogaster</i>	中国 (云南昆明)	KM893454
赤蓬毛蝠 <i>Lasiurus borealis</i>	美国	JN209842

2 结果

2.1 线粒体基因组特征

狭耳鼠耳蝠线粒体基因组总长为16 752 bp (GenBank 登录号: MT588108),由13个蛋白质编码基因、22个tRNA基因、2个rRNA(12S和16S)基因和1个非编码控制区组成(图1)。

2.2 碱基偏向性

狭耳鼠耳蝠线粒体基因组核苷酸组成比例: A为33.8%、T为30.4%、C为22.7%和G为13.1%。AT含量(64.2%)大于GC含量(35.8%),与脊椎动物普遍存在的线粒体基因组AT碱基偏向性一致。

2.3 蛋白质编码基因

狭耳鼠耳蝠线粒体基因组参与蛋白质编码的核苷酸长度为11 440 bp, *ND6*、*tRNA-Gln*、*tRNA-Ala*、*tRNA-Asn*、*tRNA-Cys*、*tRNA-Tyr*、*tRNA-Ser* (UGA)、*tRNA-Pro*和*tRNA-Glu*基因均在L链上编码,其他蛋白质编码基因在H链上编码。除*ND2*(ATT)、*ND3*(ATA)、*ND5*(ATA)和*ND6*(TAA)外,所有蛋白质编码基因都以ATG为起始密码子开始编码。6种蛋白质编码基因(*ND1*、*COX2*、*ATP8*、*ATP6*、*ND4L*和*ND5*)以TAA为终止密码子终止编码,*ND2*、*COX1*、*COX3*和*ND3*基因以TAG为终止密码子终止编码,而*Cyt b*基因以AAC为终止密码子终止编码,在*ND4*和*ND6*基因中发现了不完整的终止密码子(-T)(表2)。

表2 狭耳鼠耳蝠线粒体基因组组成

Tab. 2 Mitochondrial genomes composition of *Myotis blythii*

基因 Gene	起始位置 Start position	终止位置 Stop position	长度/bp Length	反密码子 Anticodon	起始密码子 Start codon	终止密码子 Stop codon	点位 Strand
<i>tRNA-Phe</i>	348	415	68	GAA			+
12S rRNA	416	1 387	972				+
<i>tRNA-Val</i>	1 388	1 455	68	UAC			+
16S rRNA	1 456	3 018	1 563				+
<i>tRNA-Leu</i>	3 020	3 094	75	UAA			+
<i>ND1</i>	3 100	4 056	957		ATG	TAA	+
<i>tRNA-Ile</i>	4 056	4 124	69	GAU			+
<i>tRNA-Gln</i>	4 122	4 195	74	UUG			-
<i>tRNA-Met</i>	4 196	4 265	70	CAU			+
<i>ND2</i>	4 266	5 309	1 044		ATT	TAG	+
<i>tRNA-Trp</i>	5 308	5 375	68	UCA			+
<i>tRNA-Ala</i>	5 381	5 449	69	UGC			-
<i>tRNA-Asn</i>	5 451	5 523	73	GUU			-
<i>tRNA-Cys</i>	5 556	5 621	66	GCA			-
<i>tRNA-Tyr</i>	5 622	5 687	66	GUA			-
<i>COX1</i>	5 689	7 233	1 545		ATG	TAG	+
<i>tRNA-Ser</i>	7 247	7 315	69	UGA			-
<i>tRNA-Asp</i>	7 323	7 389	67	GUC			+
<i>COX2</i>	7 390	8 073	684		ATG	TAA	+
<i>tRNA-Lys</i>	8 077	8 143	67	UUU			+
<i>ATP8</i>	8 145	8 348	204		ATG	TAA	+
<i>ATP6</i>	8 306	8 986	681		ATG	TAA	+
<i>COX3</i>	8 986	9 789	804		ATG	TAG	+
<i>tRNA-Gly</i>	9 770	9 838	69	UCC			+
<i>ND3</i>	9 839	10 195	357		ATA	TAG	+
<i>tRNA-Arg</i>	10 186	10 254	69	UCG			+
<i>ND4L</i>	10 256	10 552	297		ATG	TAA	+
<i>ND4</i>	10 546	11 923	1 378		ATG	- T	+
<i>tRNA-His</i>	11 924	12 991	68	GUG			+
<i>tRNA-Ser</i>	11 992	12 050	59	GCU			+
<i>tRNA-Leu</i>	12 052	12 121	70	UAG			+
<i>ND5</i>	12 122	13 942	1 821		ATA	TAA	+
<i>ND6</i>	13 926	14 453	528		TAA	- T	+
<i>tRNA-Glu</i>	14 454	14 522	69	UUC			-
<i>Cyt b</i>	14 529	15 668	1 140		ATG	AAC	-
<i>tRNA-Thr</i>	15 669	15 738	70	UGU			+
<i>tRNA-Pro</i>	15 738	15 803	66	UGG			+
D-loop	15 804	16 752	948				-

注: +为正链; -为负链。

Note: + is a positive chain; - is a negative chain.

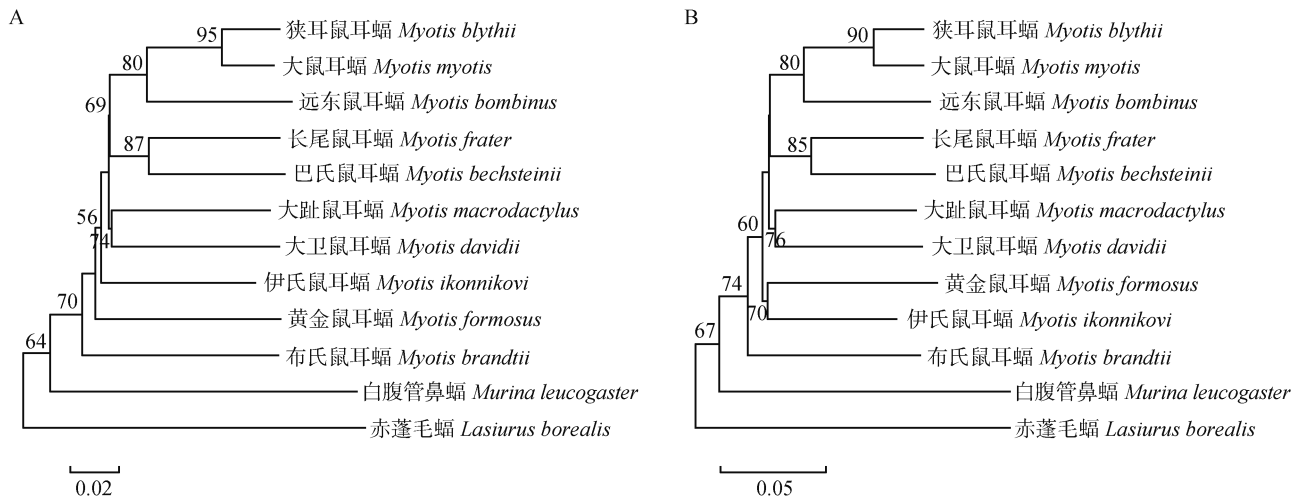


图2 鼠耳蝠属线粒体全基因组 ML(A)和 NJ(B)系统发育树

Fig. 2 ML (A) and NJ (B) phylogenetic tree based on mtDNA of *Myotis*

开展分子系统发育、进化和老龄化研究的重要资源^[10]。目前全世界鼠耳蝠属物种超过100种,中国报道27种,其中,新疆只有3种,分别为狭耳鼠耳蝠、尼泊尔鼠耳蝠(*M. nipalensis*)和大足鼠耳蝠(*M. pilosus*)^[11]。布尔根河狸自然保护区位于干旱区绿洲复合生态系统的乌伦古河谷,具有非常高的物种多样性^[12]。本研究首次获得该区域狭耳鼠耳蝠线粒体基因组并对其线粒体基因组结构和组成进行了注释和分析,丰富了该物种线粒体基因组信息,明确了新疆狭耳鼠耳蝠在鼠耳蝠属内的系统进化地位和亲缘关系,为蝙蝠科系统分子进化和后续研究提供了基础数据。

通过比较,发现布尔根河狸自然保护区狭耳鼠耳蝠线粒体基因组与其他已发表的鼠耳蝠属物种线粒体基因组组成虽然相似,但仍存在一定差异。最明显的区别在于,布尔根河狸自然保护区狭耳鼠耳蝠个体D-loop区的长度远短于中国其他地区的亚种及姊妹种的D-loop区长度,此结果暗示了该物种线粒体基因的高突变率,符合动物线粒体基因突变率比核基因突变率高的规律。钟毅^[13]研究发现,老鼠等哺乳动物有丝分裂后的组织细胞中,尽管组织细胞已停止分裂,但线粒体DNA仍然复制、更新,组织细胞在TFAM等的诱导下,线粒体DNA拷贝数目显著增加,这为线粒体DNA缺失突变的克隆扩增提供了更多机会。黄学文等^[14]对肝癌组织中线粒体DNA D-loop区碱基变异与ROS(活性氧)水平的研究表明,由于mtDNA在结构上无组蛋白或其他DNA结

合蛋白的保护,在复制中又无校正及DNA自身修复的功能,当mtDNA靠近位于线粒体内膜上的活性氧时,易受活性氧等自由基的侵害而发生突变,突变率为核DNA的10~20倍,因此mtDNA缺失突变更容易发生。布尔根河狸自然保护区狭耳属耳蝠线粒体DNA D-loop区较短的分子机制也可能与其重复序列的拷贝数有关。构建的系统发育树与Hooper等^[15]的研究结果均支持鼠耳蝠属和管鼻蝠属构成姊妹属。但这些数据和分析仍远远不足,为更好地保护新疆狭耳鼠耳蝠以及明晰狭耳鼠耳蝠与蝙蝠科其他亚科、属和亚属之间的系统发生关系,需要对该物种继续开展线粒体基因组与核基因相结合的研究。

致谢: 新疆布尔根河狸国家级自然保护区管理局为本研究提供了野外考察车辆及生活和工作上的支持和帮助,谨致衷心感谢! 衷心感谢新疆布尔根河狸国家级自然保护区管理局陈刚高工以及冯锦、端肖楠、吴兵、甄荣和任松柏等在样本采集等方面给予的大力协助。

参考文献:

- [1] SIMMONS N B, CIRRANELLO A L. Bat species of the world: a taxonomic and geographic database [DB/OL]. [2023-02-16]. <https://www.batnames.org/>.
- [2] 江廷磊, 赵华斌, 何彪, 等. 中国蝙蝠生物学研究进展及其保护对策[J]. 兽类学报, 2020, 40(6): 539-559.
JIANG T L, ZHAO H B, HE B, *et al.* Research progress of bat biology and conservation strategies in China [J]. Acta Theriologica Sinica, 2020, 40(6): 539-559.
- [3] 周江, 杨天友. 贵州省鼠耳蝠属一新纪录: 狭耳鼠耳蝠[J]. 四

- 川动物, 2012, 31(1): 120-122; 177.
- ZHOU J, YANG T Y. A new record of *Myotis blythii* in Guizhou Province[J]. Sichuan Journal of Zoology, 2012, 31(1): 120-122; 177.
- [4] REBELO H, FERREIRA S, AMORIM F, *et al.* Hidden in our pockets: building of a DNA barcode library unveils the first record of *Myotis alcaethoe* for Portugal [J]. Biodiversity Data Journal, 2020, 8: e54479.
- [5] ILIOPOULOU-GEORGUDAKI J G. Intraspecific and interpopulation morphologic variation in the sharp-eared bat, *Myotis blythii* (Tomes, 1857) (Chiroptera: Vespertilionidae), from Greece[J]. Bonn Zoological Bulletin, 1984, 35: 15-24.
- [6] RUEDI M, SAIKIA U, THABAH A, *et al.* Molecular and morphological revision of small Myotinae from the Himalayas shed new light on the poorly known genus *Submyotodon* (Chiroptera: Vespertilionidae) [J]. Mammalian Biology, 2021, 101(4): 465-480.
- [7] BERTHIER P, EXCOFFIER L, RUEDI M. Recurrent replacement of mtDNA and cryptic hybridization between two sibling bat species *Myotis myotis* and *Myotis blythii* [J]. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 2006, 273(1605): 3101-3109.
- [8] KIM Y K, PARK S G, KIM T W, *et al.* Complete mitochondrial genome of the far eastern myotis, *Myotis bombinus* (Chiroptera, Vespertilionidae)[J]. Mitochondrial DNA Part A, 2015, 28(2): 267-268.
- [9] AUSTAD S N. Cats, "rats" and bats: the comparative biology of aging in the 21st century [J]. Integrative and Comparative Biology, 2010, 50(5):783-792.
- [10] STADELMANN B, LIK L K, KUNZ T H, *et al.* Molecular phylogeny of new world *Myotis* (Chiroptera, Vespertilionidae) inferred from mitochondrial and nuclear DNA genes [J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2007, 43(1):32-48.
- [11] 中国科学院生物多样性委员会. 中国生物物种名录, 2023年度版[DB/OL]. [2023-05-25]. <http://www.sp2000.org.cn/>. The Biodiversity Committee of Chinese Academy of Sciences. Catalogue of life China 2023 annual checklist [DB/OL]. [2023-05-25]. <http://www.sp2000.org.cn/>.
- [12] 刘元超, 黄效文, 初红军, 等. 新疆布尔根河狸国家级自然保护区野生动物的红外相机监测[J]. 生物多样性, 2014, 22(6): 800-803.
- LIU Y C, HUANG X W, CHU H J, *et al.* Camera trap survey of wildlife in Buergen Beaver National Nature Reserve, Xinjiang [J]. Biodiversity Science, 2014, 22(6): 800-803.
- [13] 钟毅. 线粒体DNA常见缺失在大片段缺失突变中的作用及其发生机制[D]. 武汉: 华中科技大学, 2011.
- ZHONG Y. The role of mitochondrial common deletion in mitochondrial DNA large deletions and mechanisms for deletion formation [D]. Wuhan: Huazhong University of Science & Technology, 2011.
- [14] 黄学文, 赵琪, 陈道桢, 等. 肝癌组织中线粒体DNA D-loop区碱基变异与ROS水平[J]. 遗传, 2005, 27(1): 14-20.
- HUANG X W, ZHAO Q, CHEN D Z, *et al.* Mutations in the D-loop region of mitochondrial DNA and the ROS level in the tissue of hepatocellular carcinoma [J]. Hereditas (Beijing), 2005, 27(1): 14-20.
- [15] HOOFFER S R, VAN DEN BUSSCHE R A. Molecular phylogenetics of the chiropteran family Vespertilionidae [J]. Acta Chiropterologica, 2003, 5(Suppl. 1): 1-63.