

林麝毛发 DNA 的提取及系统发育分析

冯 慧,冯成利,刘晓农,任 轶

(陕西省动物研究所,西安 710032)

摘 要: 针对林麝及麝属动物系统分类存在较大争议的问题,采用分子标记方法,分析林麝的系统发育。利用非损伤取样方法,从秦岭林麝的毛发样品中提取得到线粒体 DNA *Cytb* 基因的部分序列,并对其进行分析。结果表明,林麝、原麝、马麝、喜马拉雅麝、黑麝是 5 种独立的种,林麝与原麝的亲缘关系最近。秦岭林麝种群的遗传多样性较低,单倍型多样性(Hd)为 0.558,核苷酸多样性(Pi)为 0.015 42。可弥补现有形态分类研究的不足,得到更有说服力的分析结果。

关键词: 林麝;线粒体 DNA;系统发育;遗传多样性

中图分类号:Q951. + 3

文献标志码: A

文章编号:1004-1389(2012)08-0014-05

Hair DNA Extraction and Phylogenetic Analysis of Forest Musk Deer (*Moschus berezovskii*)

FENG Hui, FENG Chengli, LIU Xiaonong and REN Yi

(Shaanxi Institute of Zoology, Xi'an 710032, China)

Abstract: According to the confusion of system classification of *Moschus berezovskii*, the phylogenetic of musk deer has been analyzed by the method of molecular marker. Partial DNA sequence of cytochrome *b* gene in mitochondrial genome was successfully retrieved from hair of forest musk deer collected from Shaanxi. Phylogenetic analysis using the sequence and published data indicated that forest musk deer, siberian musk deer, alpine musk deer, himalayan musk deer and tawny musk deer are five independent species. The forest musk deer has a close phylogenetic relationship to siberian musk deer and its haplotype diversity (Hd) was 0.558, nucleotide diversity (Pi) was 0.015 42. It is suggested that the forest musk deer has low genetic diversity.

Key words: Forest musk deer; Mitochondrial DNA; Phylogenetic; Genetic diversity

林麝是哺乳纲偶蹄目鹿科麝属动物^[1-2],又名香獐、獐子、山驴、林獐、麝鹿等。因雄麝在脐部和生殖器之间有香囊,能分泌和贮存麝香,故得名香獐,是珍贵的野生药用资源动物,也是国家一级保护动物^[3],现已濒临灭绝。研究生物类群之间的相互关系并构建系统树,是众多生物学家用来探索重建生物进化历史的有效手段。动物线粒体 DNA(mtDNA)是动物体内唯一发现的核外遗传物质,脊椎动物的 mtDNA 大小在 16.5 kb 左右,

为双链环状 DNA 分子,以母系遗传方式遗传,其结构简单、稳定,世代间无基因重组且进化速度较快,能更直观保存群体突变的发生。利用 mtDNA 多态性分析不仅可以在一定层面上了解种群的遗传多样性,还可以探讨群体的起源进化^[4],是一种非常实用的遗传标记。

从分子角度研究林麝系统进化的资料较少。因此,本研究对来自陕西省秦岭地区的林麝毛发样品进行 mtDNA 提取及序列测定,调用 Gen-

* 收稿日期:2012-03-28 修回日期:2012-05-22

基金项目 陕西省重大科技专项(2010ZDKG-54);陕西省科学院科技专项(2009K-02);陕西省科学技术研究发展计划项目(2012KW-21);陕西省科学院青年人才培养项目(2012K-027,2009K-25)。

第一作者:冯 慧,女,研究实习员,硕士,研究方向为分子生物学。E-mail:fenghui84@126.com

通讯作者:冯成利,男,副研究员,从事分子生物学研究。E-mail:fchengli@163.com

Bank 中麝属其他动物的同源序列进行系统发育分析。

1 材料与方 法

1.1 材 料

采集陕西省秦岭凤县地区生病、死亡林麝毛发以及在林麝活动过的地方捡拾带毛囊的毛发,带回实验室后于-80℃保存,备用。

用于 mtDNA 提取的 Chelex-100 购自 Bio-Rad 公司,引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.2 方 法

1.2.1 毛发 mtDNA 的提取 林麝毛发 mtDNA 的提取参照周月琴等[5]的方法进行,每个离心管内放置 3 根带毛囊的毛发,提取 DNA。所用玻璃器皿和塑料耗材均经过高温高压灭菌处理。另外,由于所用试验材料有些为在地上拾取的陈旧毛发,其遗传物质可能已有部分降解,提取过程中研究者及其他生物极可能对其造成外源污染。因此,在试验中设定空白提取对照,即设定除不加试验样品外,其他所有提取步骤都与样品处理完全一致的平行对照试验。

1.2.2 PCR 扩增及其产物的测定 引物 L:5'-GATATGAAAAACCATCGTTG-3'; H: 5'-CTCACCTGATATTTGTCCTCA-3'。PCR 反应总体积为 50μL,其中,10×PCR Buffer 5.0 μL, dNTP 1.0μL, DNA 模板 2 μL,上下游引物各 2 μL, Taq 酶 0.4 μL,超纯灭菌水 37.6 μL。PCR 反应体系在 95℃预变性 1 min,94℃变性 1 min,49℃退火 1 min,72℃延伸 3.5 min,35 个循环,循环结束后,72℃再延伸 10 min,4℃保存,备用。利用未加模板 DNA 的反应液作为空白对照,以检查是否有污染存在。PCR 扩增产物采用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测其片段大小与质量浓度,于-20℃保存。产物送至上海英骏生物技术有限公司进行纯化,在 ABI3730 型自动测序仪上双向测序。

1.2.3 序列测定及系统发育分析 将 PCR 纯化产物送上海生工生物工程技术有限公司进行双向测序,得到的序列分别提交 NCBI 数据库进行 Blast 查询,再正反向对比得到能双向吻合的长 271 bp 的序列,经查询后确定为林麝 Cyt b 基因序列。系统发育分析共调集 GenBank 麝属马麝、原麝、喜马拉雅麝、黑麝 4 条同源序列,用

Clustal X、DnaSP 4.0 软件进行序列分析。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增结果

利用设计的引物从林麝毛发提取样品中扩增获得产物并进行电泳(图 1)。空白对照未出现扩增产物,说明测序结果可靠。扩增条带清晰,说明用 Chelex-100 方法提取的 3 根带毛囊的毛发 DNA 已经足够 PCR 扩增所需。

2.2 同源序列差异

将测得序列与 GenBank 中另外两条林麝(GI:4587194,GI:4587192)和马麝、喜马拉雅麝、原麝、黑麝的 Cyt b 序列对比(图 2)。图 2 中 1~20 号为凤县林麝样品,21、22 号为 GenBank 中林麝 Cyt b 碱基序列,23 号为马麝序列,24 号为喜马拉雅麝序列,25 号为原麝序列,26 号为黑麝序列。从图 2 可以看出,1~20 号序列与 21、22 号样品序列基本一致,与马麝、喜马拉雅麝、原麝、黑麝的序列差异较大。

利用 Clustal X、DnaSP 4.0 软件进行分析,20 个秦岭凤县林麝样品中共有 4 种单倍型,单倍型比例为 20%。单倍型多样性为 0.558,核苷酸多样性为 1.542%(表 1)。

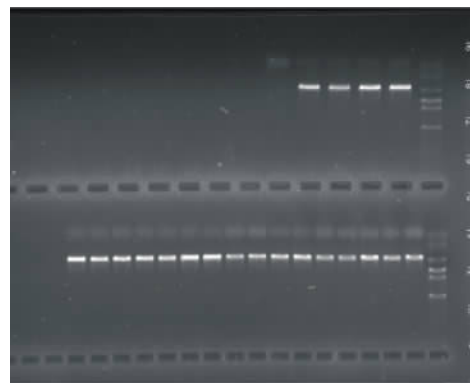


图 1 林麝毛发 mtDNA Cyt b 扩增结果

Fig. 1 The results of mtDNA Cyt b amplification from hair of task deer

表 1 林麝 mtDNA 多样性

Table 1 The mtDNA diversity of mask deer

mtDNA 多样性 mtDNA diversity	数值 Value
多态性位点 Polymorphism sites	20
单倍型数 Number of haplotypes	4
单倍型多样性 Haplotype diversity	0.558
核苷酸多样性 Nucleotide diversity	0.015 42
平均核苷酸差异数 Average number of nucleotide differences	4.132

2.3 系统进化树

将对后的序列用 Clustal X 软件进行系统发育分析,构建系统发育树。由图 3 可知,马麝、

黑麝、喜马拉雅麝、原麝、林麝为 5 个单独的种,原麝和林麝亲缘关系较近,黑麝的亲缘关系最远。

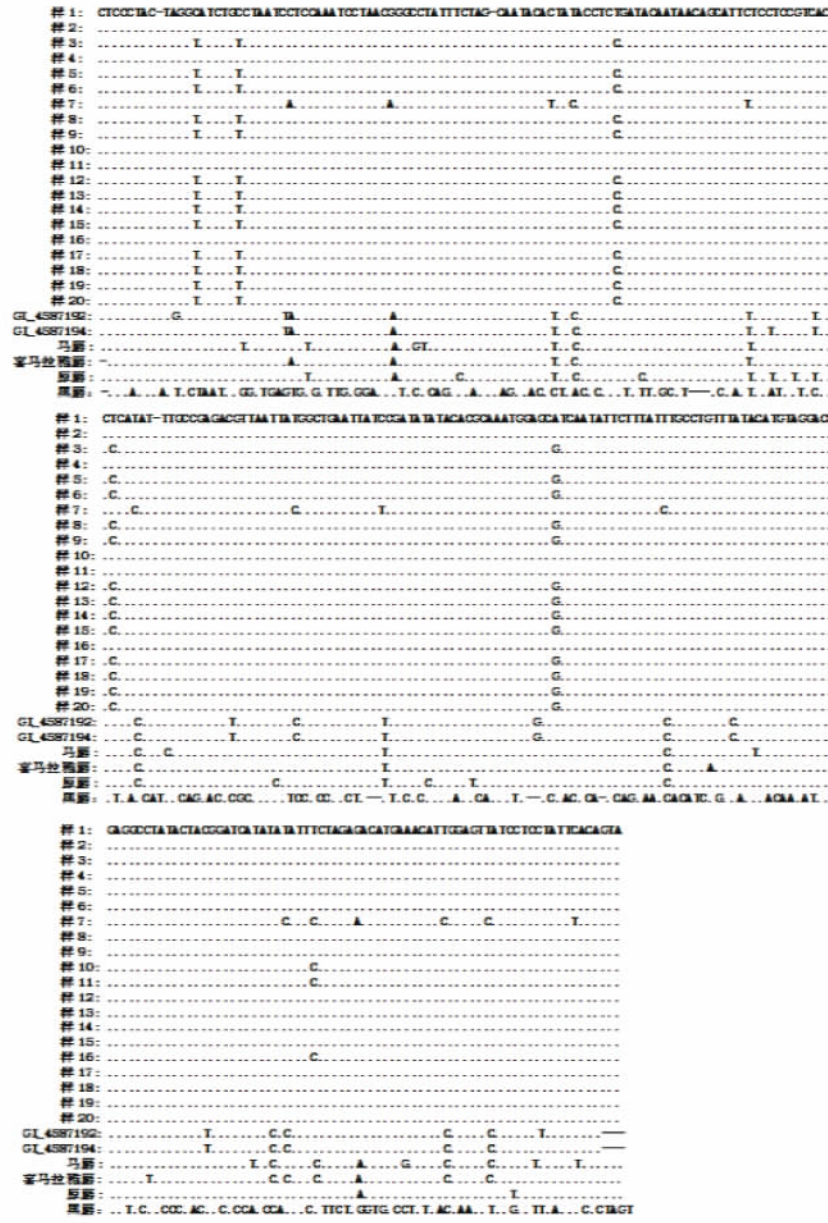


图 2 同源序列比对

Fig. 2 The figure homologous sequence alignment

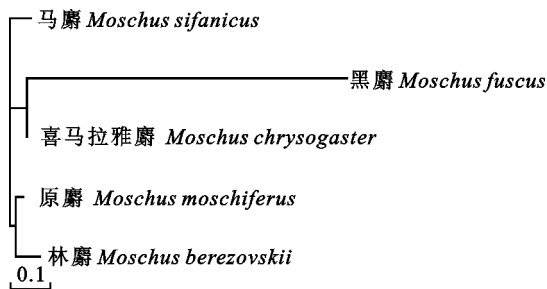


图 3 基于 Cyt b 基因部分序列构建的麝属系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of the Cyt b sequence of mask deer

3 讨论

3.1 非损伤性取样与濒危动物保护

对于濒危动物而言,采用传统的伤害性取样方法一方面会对动物的身体甚至生命造成一定威胁,另一方面由于动物天生的警觉性及栖息地复杂等原因给取样工作造成一定的难度。因此,不触及或伤害动物本身的非损伤取样方法显示出其独特的优越性。在动物脱落的毛发、排泄的粪便

尿液、进食时留下的食物残渣等不同形式的样品中,都或多或少地残留有从该动物不同组织器官脱落的体细胞,如果能采用适当的提取分析方法,即可得到其中包含的遗传信息,用于后期的遗传或系统发育分析^[6-10]。本研究即采用非损伤性取样的方法收集林麝带毛囊的脱落毛发,选用可作为偶蹄目动物进化研究最有力证据的 *Cyt b* 基因为目标基因^[11],不仅未对林麝造成任何损伤,研究中得到部分遗传信息经过分析后还将为保护该物种提供更多的科学依据。

3.2 系统发育

mtDNA 是核外遗传物质,符合母系遗传的特点,在母系起源与驯化研究中具有重要的意义。麝科种的分类问题长期存在分歧,高耀亭^[12]确定麝属分为 3 个独立种,即原麝、马麝、林麝。蔡桂全等^[13]发表了喜马拉雅麝,李致祥^[14]发表了黑麝。章敬旗等^[15]对几种麝头骨的 28 项测量指标进行主成分分析。结果显示,这 5 种麝都是独立的种。本研究从分子水平证明该结论是正确的。

从地理分布来看,原麝在国内主要分布于黑龙江、吉林和辽宁^[12]。马麝见于青藏高原及邻近各省;林麝数量多,宁夏六盘山以南至各省区均有分布;喜马拉雅麝只分布在西藏少数地区;黑麝分布在西藏和云南的少数地区。这 4 种麝都以喜马拉雅横断山脉为中心,分布于相邻不同地区^[12-14, 16],故可以推定,喜马拉雅横断山脉地区是麝种的起源中心。另外,由于林麝的分布区范围最广^[17],适应多变的生活环境,是进化程度最高的一种麝^[15]。从 5 种麝的聚类分析结果(图 3)看,原麝和林麝最先聚到一起,亲缘关系较近,马麝、黑麝和喜马拉雅麝亲缘关系较远。本研究从分子水平验证章敬旗等^[15]的分析结果,认为在进化过程中马麝、黑麝和喜马拉雅麝首先被排挤到高原高山地带,而原麝和安徽麝则是由于林麝辐射到特定的地区后长期的地理隔离产生生殖隔离,逐渐分化为新的物种。

但是对麝属的分类地位依然有很多不同意见,Leinders 等^[18]提出将麝归为鹿科,Scott 等^[19]提出将麝归为牛科,Webb 等^[20]提出将麝提升为单独的科,与牛科、鹿科并列。因此,针对麝分类地位问题探讨中出现的研究争议,有必要对麝属动物进行更加细致深入的分子系统学及古生物学研究,并将二者的研究结果相互结合分析。通过开展古代材料与现代生物个体遗传信息的同源性

比对,即可检验建立在现代生物材料基础上的系统发育分析的可靠性^[21]。此外,对古地理古气候条件、原始人类的生活环境及林麝本身的起源、迁移和演化过程等研究,都将具有十分重要的意义。

3.3 遗传多样性

遗传多样性是估计种群长期生存可能性重要指标,也是生物学上制定保护计划所必需的内容之一。遗传多样性的丧失会引起个体繁殖适合度的下降。单倍型多样性值(Hd)和核苷酸多样性值(Pi)是衡量一个群体 mtDNA 变异程度的两个指标。Hd 值是单倍型多样性,指样本中随机抽取到两个不同单倍型的频率;Pi 值是核苷酸多样性,指序列间每个位点的平均核苷酸差异数。Hd 值和 Pi 值越大,群体的多态程度越高,遗传多样性越丰富^[22]。从图 2 序列比对结果来看,凤县林麝共有 4 个单倍型,单倍型比例仅为 20%,Hd 值和 Pi 值都处于中下水平。低于其他某些珍稀野生动物,如藏羚羊的线粒体核苷酸多样性值为 2.96%^[23],太平洋白鳍豚的线粒体核苷酸多样性值为 1.65%^[24]。

由于人口的不断增加,人们的经济活动范围不断扩大,使野生动物的生存空间受到不同程度的破坏。如山区高速公路的修建使野生动物的栖息地破碎为不连续的小区^[25],片断化过程不断加剧,栖息地“岛屿”不断缩小。林麝的栖息地受到极大影响,小种群间无法进行基因交流,使林麝的遗传多样性变低。导致林麝遗传多样性低的原因还有本次采样有 11 只来自圈养种群,圈养种群的数量过低,则不可避免的会发生近亲繁殖,社群间缺少基因交换,遗传逐渐衰竭,使其生命力和繁殖力下降,疫病增加,从而危及种群生存。因此,制定科学有效的保护政策应当以保护物种的遗传多样性为主要内容。这一研究结果也再次说明保护林麝的遗传多样性已刻不容缓。

参考文献:

- [1] 盛和林. 中国鹿类动物[M]. 上海:华东师范大学出版社, 1992.
- [2] 彭红元,陈伟才,张修月. 麝的分类研究概述[J]. 玉林师范学院学报:自然科学版,2010,32(2):66-72.
- [3] 汪 松,解 焱. 中国物种红色名录(第一卷):红色名录[M]. 北京:高等教育出版社,2004.
- [4] 周继亮,张亚平,黄美华,等. 蝮亚科蛇线粒体细胞色素 *b* 基因序列分析及其系统发育[J]. 动物学报,2001,47(4):361-366.

- [5] 周月琴,朱伟,刘志萍,等.用 Chelex-100 快速提取微量血痕中的 DNA[J].复旦学报:医学版,2003,30:379-380.
- [6] Randi E, Mucci N, Pierpaoli M, et al. New phylogenetic perspectives on the Cervidae (Artiodactyla) are provided by the mitochondrial cytochrome *b* gene[J]. Proc R Soc Lond B, 1998, 265:793-801.
- [7] 李明,魏辅文,饶刚,等.非损伤性取样法在保护遗传学研究中的应用[J].动物学报,2001,47(3):338-342.
- [8] Ludt C J, Schroeder W, Rottmann O, et al. Mitochondrial DNA phylogeography of red deer (*Cervus elaphus*) [J]. Mol Phylogenet Evol, 2004, 31(3):1064-1083.
- [9] Kuehn R, Ludt C J, Schroeder W, et al. Molecular phylogeny of *Megaloceros giganteus*—the giant deer or just a giant red deer? [J]. Zoological Science, 2005, 22:1031-1044.
- [10] Wada K, Nishibori M, Yokohama M. The complete nucleotide sequence of mitochondrial genome in the Japanese Sika deer (*Cervus nippon*), and a phylogenetic analysis between Cervidae and Bovidae [J]. Small Ruminant Research, 2007, 69(1-3):46-54.
- [11] Pitra C, Fickel J, Meijaard E, et al. Evolution and phylogeny of old world deer [J]. Mol Phylogenet Eol, 2004, 33:880-895.
- [12] 高耀亭.中国麝的分类[J].动物学报,1996,15(3):479-487.
- [13] 蔡桂全,冯祚建.喜马拉雅麝在我国的发现及麝属的分类探讨[J].动物分类学报,1981,6(1):106-110.
- [14] 李致祥.中国麝一新种的记述[J].动物学研究,1981,2(2):157.
- [15] 章敬旗,周友兵,徐伟霞,等.几种麝分类地位的探讨[J].西华师范大学学报:自然科学版,2004,25(3):251-255.
- [16] 王西之,胡锦矗.四川兽类原色图鉴[M].北京:中国林业出版社,1999.
- [17] 张荣祖.中国动物地理[M].北京:科学出版社,1999.
- [18] Leinders J J, Heintz E. The configuration of the lacrimal orifice in pecorans and tragulids (Artiodactyla; Mallalia) and its significance for the distinction between Bovidae and Cervidae [J]. Beaufortia, 1980, 30:155-160.
- [19] Scott K M, Janis C M. Phylogenetic relationships of the Cervidae, and the case for a superfamily "Cervoidea" [M]//Wemmer C M. Biology and management of the Cervidae. Washington Smithsonian Inst. Press, 1987:3-20.
- [20] Webb S D, Taylor B E. The Phylogeny of hornless ruminants and description of the cranium of *Archaeomerys* [J]. Bulletin of the American Museum of Natural History, 1980, 167:121-157.
- [21] 盛桂莲,吴恋娟,高照民,等.湖北石首麝粪便 DNA 的提取及系统发育分析[J].华中师范大学学报:自然科学版,2009,43(3):468-473.
- [22] 张丽,滚双宝,雷天云,等.应用 mtDNA *Cytb* 基因全序列分析中国 5 个马鹿群体的遗传多样性和系统发育[J].华北农学报,2010,25(4):12-16.
- [23] 周慧,李迪强,张于光,等.藏羚羊 mtDNA D-Loop 区遗传多样性研究[J].遗传,2006,28(3):299-305.
- [24] Hayano A, Yoshioka M, Tanaka M, et al. Population differentiation in the Pacific white-sided dolphin *Lagenorhynchus obliquidens* inferred from mitochondrial DNA and microsatellite analyses [J]. Zoological Science, 2004, 21(9):989-999.
- [25] 王成玉,陈飞.山区高速公路对野生动物的影响及保护措施探讨[J].公路,2007(12):97-101.

(上接第 9 页)

参考文献:

- [1] 刘海霞,邵春艳,尉鹏,等.手术致奶牛真胃左方变位对其瘤胃、真胃和血液相关指标的影响[J].安徽农业科学,2010,38(30):16945-16947.
- [2] Gregory P C. Inhibition of forestomach motility by short chain volatile fatty acids in sheep [J]. Anim Sci, 1984, 64:11.
- [3] 李伟忠,单安山.挥发性脂肪酸在动物体内的作用[J].中国饲料,2003(12):23-26.
- [4] 朱祖康.颈静脉注射丙酸或乙酸钠溶液对山羊瘤胃运动的影响[J].南京农业大学学报,1991,14(1):89.
- [5] 祁生旺,刘俊平,麻生福.奶牛产后真胃变位治疗方法比较[J].中国兽医杂志,2002,38(10):20-21.
- [6] 刘俊栋,刘海霞,刘新武,等.手术致山羊真胃左方变位对瘤胃 VFA 及血清胃泌素的影响[J].中国草食动物,2007,27(4):46-48.
- [7] 刘俊栋,刘海霞,方希修,等.黄牛皱胃积食前后瘤胃内容物 pH 值与纤毛虫数量变化的观察[J].黄牛杂志,2003,29(4):18-20.
- [8] 梁金平,张洪友,王相友,等.实验性真胃左方变位奶牛血液、瘤胃液及真胃液参数的变化[J].中国兽医学报,2008,28(6):711-714.