

棕背鼠和红背鼠种间区分的分子方法

金建丽 刘 铸 郝爱平 杨春文* 金志民

(牡丹江师范学院生物学系 牡丹江 157012)

摘要: 棕背鼠 (*Myodes rufocanus*) 和红背鼠 (*M. rutilus*) 的分布有重叠区且外形相似, 在特定情况下存在种间区分困难, 给两种鼠的数量调查带来不便和误判。本研究通过 mtDNA 控制区构建系统树、mtDNA 控制区电泳和 RAPD 3 种分子生物学方法有效地对棕背鼠和红背鼠已知的 8 个样本和 16 个待定样本进行了准确鉴定。其中, mtDNA 控制区电泳进行种间区分的方法具有简便、准确而又快捷的优点。

关键词: 棕背鼠; 红背鼠; 种间区分; 分子生物学

中图分类号: Q958 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2009)03-127-05

Delimiting the *Myodes rufocanus* and *M. rutilus* Species by Molecular Methods

JIN Jian-Li LIU Zhu HAO Ai-Ping YANG Chun-Wen* JIN Zhi-Min

(Department of Biology, Mudanjiang Teachers' College, Mudanjiang 157012, China)

Abstract: *Myodes rufocanus* and *M. rutilus* have overlapping range and similar morphological characteristics. It is hard to distinguish these two species under some conditions, which brings inconvenience and miscalculation to their number investigations. Eight known samples and sixteen unknown samples of *M. rufocanus* and *M. rutilus* are correctly identified by three molecular methods: phylogenetic tree based on sequences of mtDNA control region, electrophoresis of mtDNA control region, and the RAPD). Electrophoresis of mtDNA control region shows the advantages of convenience, accuracy and time-saving.

Key words: *Myodes rufocanus*; *M. rutilus*; Species identification; Molecular biology

棕背鼠 (*Myodes rufocanus*) 和红背鼠 (*M. rutilus*) 同属于啮齿目仓鼠科鼠属, 是我国北方森林小型哺乳动物的重要组成成分, 也是主要的林木害鼠。因此, 其种群数量动态一直受到国内外学者的关注^[1-6]。由于棕背鼠和红背鼠的分布有重叠区且外形相似^[7], 形态学分类多利用第三枚臼齿的形状、尾长、个体大小、背毛颜色、耳内缘毛色等进行区分, 这些方法在多数情况下尤其是对死体鉴定无误, 但是在野外用标志重捕法调查时, 很难利用形态特征进行区分, 给研究工作带来不便。

一些学者已经利用核型分析、同工酶等方法进行了种间区分研究, 核型分析结果显示, 棕

背鼠的 Y 染色体 A 形态, 而红背鼠的为 A 或 SM 形态, 判断性状存在重复^[8]。同工酶研究^[2]也存在上述情况, 而且必须处死动物, 不适用于标志重捕法。随着分子生物学技术的广泛应用, 为探讨和解决种间区分、物种分类地位、亲缘关系提供了重要的方法及手段^[9,10]。线粒体 DNA 的进化速度快, 变异程度较高, 严格的母

基金项目 黑龙江省教育厅项目 (No. 11511420), 黑龙江省自然科学基金项目 (No. C200626);

*通讯作者, E-mail: yangchunwen@sina.com;

第一作者介绍 金建丽, 女, 教授; 研究方向: 动物生态、生理生化; E-mail: swxjll@126.com。

收稿日期: 2008-11-19, 修回日期: 2009-03-29

性遗传,而且控制区的碱基替换率是线粒体 DNA 其他区段的 2.8 倍到 5 倍,因而是探讨种间区分和近缘种系统发生的良好遗传标记^[11]。RAPD(random amplified polymorphic DNA)技术具有效率高、样品用量少、灵敏度高、特异性强和检测容易等优点,目前在生物物种鉴定、亲缘关系和系统进化等方面已得到广泛的应用^[12,13]。本文期望寻找一种准确、且对棕背麝与红背麝无伤害的分子区分方法。

1 材料与方法

1.1 材料 样本取自大兴安岭新林林区和长白山林区,每处各取棕背麝 2 只、红背麝 2 只。棕背麝:ZD1()、ZD2()、ZC3()和 ZC4();红背麝:HD1()、HD2()、HC3()、HC4(),通过第三枚臼齿内侧突角数量鉴定物种,作为已知样本。同时采用标志重捕法调查时,在大兴安岭选 11 只(DD1~DD11)、长白山选 5 只(CD1~CD5)作为待定样本,采用非伤害性取样,拔取 30 根针毛^[14],置于液氮罐中保存。

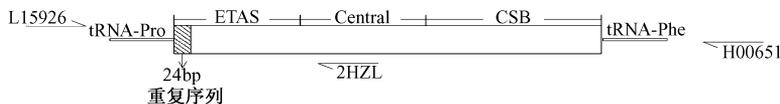


图 1 mtDNA 控制区引物 L15926、H00651 和 2HZL 的分布

Fig. 1 Ranging of primers (L15926, H00651 and 2HZL) on mtDNA control region

RAPD 扩增程序为:预变性 94 5 min;变性 94 1 min,退火 36 30 s,延伸 72 2 min,共循环 40 次,完成最后一次循环后 72 延伸 10 min。从自行设计的 30 个引物中筛选出 3 个引物:C2985(5'-GTG CTC TAG A-3')、C2995(5'-CCA CGG GAA G-3')和 C2997(5'-TCA GAG CGC C-3'),由上海生工生物工程服务技术有限公司(Sangon)合成,利用此 3 个引物进行单引物扩增。

1.2.3 电泳及测序 引物 L15926/H00651 对 mtDNA 控制区扩增的产物经 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测。纯化回收,进行测序。取 5 μl mtDNA 控制区引物 L15926/2HZL 扩增产物及 5

1.2 实验方法

1.2.1 基因组 DNA 提取 取 10 根毛剪成小段,样本在消化前加入 10 μl 1 mol/L DTT 以破坏二硫键。用酚-氯仿法对样本基因组 DNA 进行提取。提取产物的含量和纯度均在蛋白质核酸分析仪 DU640 (Beckman 公司)上进行检测。样品用 TE 调整 DNA 终浓度至 100 ng/μl,样品于 4℃ 保存备用。

1.2.2 PCR 扩增 反应体系为 10 μl,含 200 μmol/L 的 dNTP,1.5 mmol/L 的 MgCl₂,引物各 2 pmol, *Taq* DNA 聚合酶 0.5 U (大连宝生物公司),模板 DNA 100 ng。mtDNA 控制区扩增程序为:预变性 94 3 min;变性 94 30 s,退火 55 30 s,延伸 72 1 min,共循环 35 次;72 延伸 7 min。所运用的引物为:L15926(5'-TCA AGC TTA CAG TCT TGT AAA CC-3')、H00651(5'-TAA CTG CAG AAG GCT AGG ACC AAA CCT-3')和 2HZL(5'-TGG GCG GGT TGT TGGT TIC ACG G-3')^[15,16],mtDNA 控制区序列的 3 个引物的分布位置及 24 bp 重复序列位置见图 1。

μl 引物 L15926/2HZL 红背麝 扩增产物,在 3% 的琼脂糖凝胶上电泳 30 min,RAPD 扩增产物在 2% 的琼脂糖凝胶上电泳 2 h,电泳结果用凝胶成像仪(Vilber Lourmat 公司)进行拍照记录。

1.3 统计分析 对测序获得的 mtDNA 控制区序列,通过 GenBank 下载相应物种序列进行对比。序列使用 EditSeq(DNASTAR 软件包)进行序列编辑,再利用 Clustal W 软件进行序列聚类对比,用 MEGA 3.0 的 NJ 法构建带有 bootstrap 检测值的系统树。

2 结果

2.1 mtDNA 控制区构建系统树种间区分结果

对引物 L15926/H00651 扩增 mtDNA 控制区的产物进行测序,测序后发现棕背鼯比红背鼯多 24 bp,而引物 H00651 扩增序列较长,不利于棕背鼯和红背鼯的比对。用引物 L15926/2HZL 扩增 mtDNA 控制区。通过测序获得 4 只棕背鼯 (ZD1、ZD2、ZC3、ZC4) mtDNA 控制区前 625 bp 的序列和 4 只红背鼯 (HD1、HD2、HC3、HC4)

mtDNA 控制区前 597 bp 的序列,并且从 GenBank 中下载 3 只棕背鼯 (D42091、AF367200、AF367201) 和 3 只红背鼯 (AF367188、AF367189、AF367191) 的相应序列。对这些序列构建的 NJ 系统树进行种间区分(图 2)。系统树明显分成两大支,上面一支为红背鼯物种分支,下面一支为棕背鼯物种分支。

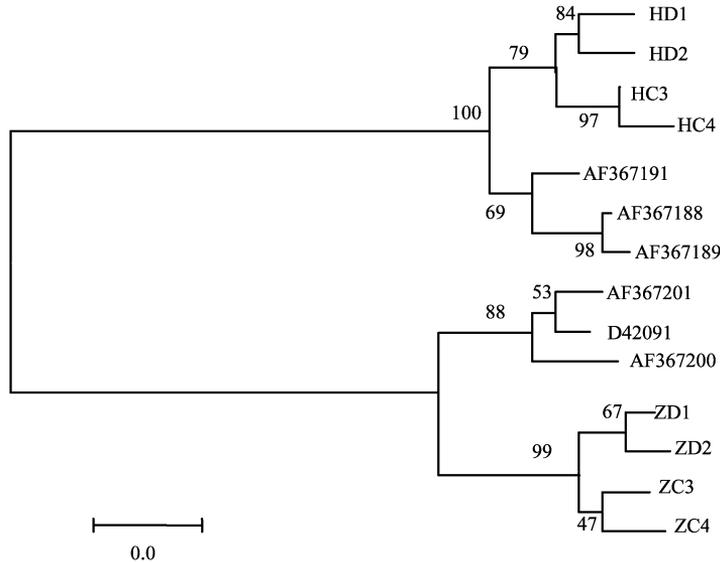


图 2 棕背鼯和红背鼯 mtDNA 控制区序列的 NJ 树

Fig. 2 NJ tree of *M. rufocanus* and *M. rutilus* on sequence of mtDNA control region

分支上的数值为自举检验值;ZD1、ZD2、ZC3 和 ZC4 为实验所取棕背鼯样本;HD1、HD2、HC3 和 HC4 为实验所取红背鼯样本;D42091、AF367200 和 AF367201 为从 GenBank 中下载 3 只棕背鼯的相应序列;AF367188、AF367189 和 AF367191 为从 GenBank 中下载 3 只红背鼯的相应序列;标尺代表遗传距离。

The numbers on the branch are bootstrap values; ZD1, ZD2, ZC3 and ZC4 are *Myodes rufocanus* samples used in the experiment. HD1, HD2, HD3 and HD4 are *M. rutilus* samples used in the experiment; D42091, AF367200 and AF367201 are the correlation sequences of the three *M. rufocanus* downloaded from GenBank; AF367188, AF367189 and AF367191 are the correlation sequences of the three *M. rutilus* downloaded from GenBank; The scale indicates genetic distances.

2.2 mtDNA 控制区电泳种间区分结果 通过测序并与 GenBank 下载获得的两个物种的 mtDNA 控制区序列进行对比分析发现,两个物种在该序列起始端存在明显区别,棕背鼯比红背鼯多一个 24 bp 的重复序列 (TACATAAAT TTATATAGTACATAG) (图 1)。电泳结果中出现单条带的样本为红背鼯,出现双条带的样本为棕背鼯。待定样本鉴定的结果见表 1。

2.3 RAPD 种间区分结果 利用具有种间特异性的 RAPD 引物 C2985、C2995 和 C2997,对未知样本的鉴定结果(图 3)与 mtDNA 控制区电泳种间区分结果一致,图 3 箭头所指条带为红背鼯区别于棕背鼯的条带,在引物 C2985 和 C2997 图谱中箭头所指位置有条带的为红背鼯,在引物 C2995 图谱中箭头所指位置有条带的为棕背鼯。

表 1 棕背鼯和红背鼯待定样本的鉴定结果

Table 1 The identification results of unknown sample of *M. rufocanus* and *M. rutilus*

样本 Samples	鉴定结果 Results of identification						
DD1	红背鼯 <i>M. rutilus</i>	DD5	红背鼯 <i>M. rutilus</i>	DD9	红背鼯 <i>M. rutilus</i>	CD2	棕背鼯 <i>M. rufocanus</i>
DD2	红背鼯 <i>M. rutilus</i>	DD6	红背鼯 <i>M. rutilus</i>	DD10	棕背鼯 <i>M. rufocanus</i>	CD3	红背鼯 <i>M. rutilus</i>
DD3	棕背鼯 <i>M. rufocanus</i>	DD7	红背鼯 <i>M. rutilus</i>	DD11	棕背鼯 <i>M. rufocanus</i>	CD4	棕背鼯 <i>M. rufocanus</i>
DD4	红背鼯 <i>M. rutilus</i>	DD8	棕背鼯 <i>M. rufocanus</i>	CD1	红背鼯 <i>M. rutilus</i>	CD5	棕背鼯 <i>M. rufocanus</i>

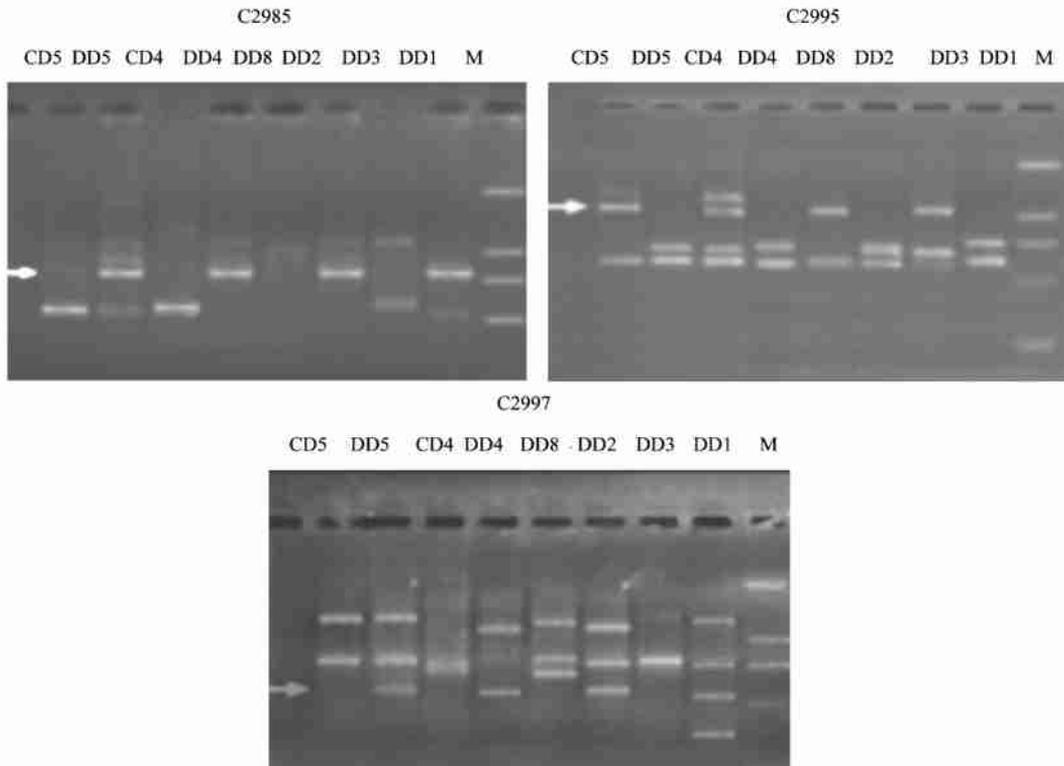


图 3 RAPD 的 3 个引物对于待定样本的种间区分结果

Fig. 3 Results of species identification for unknown sample using 3 primers of RAPD

C2985、C2995 和 C2997 为用于 RAPD 分析的 3 个引物；DD8、DD3、CD5 和 CD4 为棕背鼯待定样本；DD5、DD4、DD2 和 DD1 为红背鼯待定样本；M 为 DNA 相对分子质量标准。

C2985, C2995 and C2997 are the three primers used in the RAPD analysis; DD8, DD3, CD5 and CD4 are undetermined *Myodes rufocanus* samples; DD5, DD4, DD2 and DD1 are undetermined *M. rutilus* samples; M indicates the standard of DNA relative molecular mass.

3 讨论

形态学在物种分类上已经形成了完整的体系,是常用的依据。采用分子方法进行种间区分的应用也在不断扩展^[17],在特殊情况下对一些特殊种类,分子方法是非常有用的。例如对棕背鼯和红背鼯采用标志重捕法进行数量调查

时,利用形态学方法进行种间区分十分困难,但通过非伤害性取样用分子方法进行种间区分比较适合。分子方法实质是通过物种间最根本的差异——DNA 差异,进行种间区分,因此,区分结果科学、准确^[18]。

目前,mtDNA 在系统发生学及分类学上发挥着重要的作用。根据种间的 mtDNA 多态性

分析,可以推算出种间在系统发生上的亲缘关系,从而为经典的、形态学上难以确定的分类关系提供有价值的线索^[19]。本研究结果显示,mtDNA 控制区通过扩增、测序建立系统树能够准确区分所涉及的两个相近物种,但 mtDNA 控制区构建系统树进行种间区分需要测序和系统分析,较为费时。

引物 L15926/2HZL 扩增产物大小在 250 bp 左右,此段序列的棕背鼯片段比红背鼯多 24 bp,因此两个物种的扩增序列可以通过 3% 的琼脂糖电泳区分。250 bp 左右的片段对于样本的质量要求不高,甚至略腐败的样本、不完整的毛发和粪便样本都能满足取样的要求。

利用具有种间特异性的 RAPD 引物和 mtDNA 控制区电泳进行种间区分有着共同的简便、直观而又快捷的优点。然而,RAPD 标记自身有局限性,由于影响 RAPD 反应的因素很多,结果不稳定、重复性较差^[20]。因此,在利用 RAPD 引物进行种间区分时,至少要进行两次以上重复实验来鉴定结果。

参 考 文 献

- [1] 夏武平. 带岭林区采伐后短期内鼠类数量变动的趋势. 动物学报, 1958, 10(4): 431 ~ 437.
- [2] 杨春文, 金建丽. 棕背鼯研究. 北京: 科学出版社, 2003, 37 ~ 39.
- [3] 杨春文, 金建丽. 长白山地林区棕背鼯秋季种群数量的预测. 兽类学报, 2003, 23(1): 85 ~ 88.
- [4] 太田嘉四夫. 北海道産野ネズミ類の研究. 北海道: 北海道大学刊行会, 1984, 145 ~ 258.
- [5] Saitoh T, Stenseth N C, Bjornstad O N. The population dynamics of the Vole *Clethrionomys rufocanus* in Hokkaido, Japan. *Res Popul Ecol*, 1998, 40(1): 61 ~ 76.
- [6] Saitoh T, Osawa J, Takaniishi T, et al. Effects of acorn masting on population dynamics of three forest-dwelling rodent species in Hokkaido, Japan. *Population Ecology*, 2007, 49: 249 ~ 256.
- [7] 姜建青, 马勇, 罗泽珣. 中国棕背鼯亚种分化的研究. 动物分类学报, 1993, 18(1): 114 ~ 122.
- [8] 陈宜峰, 郭建民. 哺乳动物染色体. 北京: 科学出版社, 1986, 103 ~ 104.
- [9] Wiens J J, Penkrot T A. Delimiting species using DNA and morphological variation and discordant species limits in spiny lizards (*Sceloporus*). *Systematic Biology*, 2002, 51: 69 ~ 91.
- [10] Avise J C. *Phylogeography: the history and formation of species*. Cambridge, MA: Harvard University Press, 2000, 1 ~ 447.
- [11] Riddle R, Hafner D J, Alexander L F. Comparative phylogeography of Baileys' pocket mouse *Chaetodipus baileyi* and the *Peromyscus eremicus* species group: historical vicariance of the Baja California peninsular desert. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2000, 17: 161 ~ 172.
- [12] Jain A S, Bhatia S S, Banga, et al. Potential use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique to study the genetic diversity in Indian mustard (*Brassica juncea*) and its relationship to heterosis. *Theor Appl Genet*, 1994, 88: 116 ~ 122.
- [13] Garner K J, Slavicek J M. Identification and characterization of a RAPD-PCR marker for distinguishing Asian and North American gypsy moths. *Insect Molecular Biology*, 1996, 5: 81 ~ 91.
- [14] Taberlet P, Waits L P, Luikart G. Noninvasive sampling: look before you leap. *Trends in Ecology and Evolution*, 1999, 14: 323 ~ 327.
- [15] Kocher T D, Thomas W K, Meyer A, et al. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proc Natl Acad Sci*, 1989, 86: 6 196 ~ 6 200.
- [16] Stacy J E, Jorde P E, Steen H, et al. Lack of concordance between mtDNA gene flow and population density fluctuations in the bank vole. *Molecular Ecology*, 1997, 6: 751 ~ 759.
- [17] Moore W S. Inferring phylogenies from mtDNA variation: Mitochondrial-gene versus nuclear-gene trees. *Evolution*, 1995, 49: 718 ~ 726.
- [18] Mullis K B, Fallona F A. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymol*, 1987, 155: 335 ~ 350.
- [19] Boore J. Survey and summary animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Research*, 1999, 27: 1 767 ~ 1 780.
- [20] Lowe A J, Hancette O, Buarino L. A standard molecular genetic technique used in identify of germplasm resource: random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Plant Genetic Resources Newsletter*, 1996, 107: 50 ~ 54.