

# 川金丝猴 mDNA D-loop 序列遗传多态性分析

何丽 张于光 李迪强\* 李大全

(新疆石河子大学动物科技学院 石河子 832000;

中国林业科学研究院森林生态环境与保护研究所 国家林业局森林生态环境重点实验室 北京 100091)

**摘要:**采用非损伤性 DNA 分析技术,分析了甘肃白水江保护区、陕西长青保护区、湖北神农架保护区 3 个川金丝猴 (*Rhinopithecus roxellana*) 种群中的 20 份粪便样品和 2 份肌肉样品,成功扩增了 mDNA D-loop 区部分片段。经过 GenBank 数据库的 BLAST 比对,确定了 22 份样品均来自川金丝猴,经过 Clustal W 和 DNASP 软件分析,在 22 份川金丝猴 mDNA D-loop 区 393 bp 中,共检测出 54 个多态性位点,分为 17 个单倍型,单倍型多态性 ( $h$ ) 为 0.965,核苷酸多态性 (%) 为 3.10%。3 个种群之间的遗传距离为 0.003 ~ 0.098,核苷酸差异为 0.08% ~ 2.80%,表明所得到的川金丝猴样品中存在着较丰富的遗传多态性,种群间存在一定的遗传差异。

**关键词:**川金丝猴;线粒体 D-loop 区;单倍型;遗传多样性

**中图分类号:**Q751 **文献标识码:**A **文章编号:**0250-3263(2010)01-70-07

## Analysis on Mitochondrial DNA D-loop Sequences Genetic Polymorphism of *Rhinopithecus roxellana*

HE Li ZHANG Yu-Guang LIDi-Qiang\* LIDa-Quan

(College of Animal Science, Xinjiang Shihezi University, Xinjiang Shihezi 832000;

Institute of Forest Ecology, Environment and Protection, and the Key Laboratory of Forest Ecology and Environment of State Forestry Administration, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China)

**Abstract:** By using noninvasive DNA technology, 20 fecal samples and 2 muscle samples of Sichuan Snub-nosed Monkeys (*Rhinopithecus roxellana*) from Baishuijiang Nature Reserve of Gansu province (BSJ), Changqing Nature Reserve of Shaanxi Province (SH) and Shennongjia Nature Reserve of Hubei Province (SNJ) were analyzed and the mitochondrial DNA D-loop fragments were successfully amplified. Sequences were aligned with the GenBank by BLAST software and 22 samples were identified as *R. roxellana*. According to the analysis by ClustalW and DNASP software, 17 haplotypes and 54 diversity sites were found in 22 Sichuan snub-nosed monkey samples with 393 bp length of mDNA D-loop region. The haplotype diversity was 0.965 and nucleotide diversity was 3.10%. The genetic distance and nucleotide divergence of *R. roxellana* among BSJ, SH, and SNJ were 0.003 - 0.098 and 0.08% - 2.80%, respectively. Therefore, the results show a high variation in the mitochondrial DNA D-loop region and genetic distance of *R. roxellana* from the three sampling sites.

**Key words:** Sichuan Snub-nosed Monkey (*Rhinopithecus roxellana*); Mitochondrial DNA D-loop region;

**基金项目** 国家“十一五”科技支撑计划项目 (No. 2006BAD03A1202, 2007BAC03A08-5), 国家科技基础条件平台建设项目 (No. 2005DKA21404);

\*通讯作者, E-mail: lidq@caf.ac.cn;

**第一作者介绍** 何丽,女,博士研究生;研究方向:动物遗传学;E-mail: heliyiyi@163.com.

**收稿日期:**2009-08-06, **修回日期:**2009-10-29

Haplotype; Genetic diversity

川金丝猴 (*Rhinopithecus roxellana*) 隶属于灵长目 (Primates) 猴科 (Cercopithecidae) 疣猴亚科 (Colobinae) 仰鼻猴属, 由于长期乱捕滥杀、大面积森林砍伐和毁林开荒等人类活动, 导致川金丝猴处于濒危的状态, 野外统计显示, 其总的群体大小为 10 000 ~ 20 000 只左右<sup>[1]</sup>。川金丝猴已被濒危野生动植物国际贸易公约和 IUCN 定为濒危物种, 同时也是我国一级保护野生动物。Li 等通过查阅和分析我国古代距今 400 多年来的历史文献, 认为是人类的活动导致川金丝猴的栖息地持续缩小, 直到形成现今的 3 个主要区域<sup>[2]</sup>, 即四川和甘肃南部、秦岭以及湖北神农架地区<sup>[3]</sup>。

近几十年来, 山区开发、过量采伐森林等人为活动影响的加剧, 使川金丝猴的栖息地受到严重破坏, 分布区面积不断缩小, 为了更好地保护该珍稀物种, 必须对现存川金丝猴种群的遗传结构进行研究。遗传多样性的丧失对物种生存带来直接的不利影响, 可以使物种更易灭绝<sup>[4-5]</sup>。濒危物种遗传多样性的丧失, 主要与物种数量的下降和遗传漂变有关<sup>[6]</sup>。随着保护遗传学被广泛用于包括濒危物种在内的研究和保护<sup>[7]</sup>, 分子方法结合野外种群的非损伤性采样 (粪便和毛发等) 越来越普遍<sup>[8]</sup>, 为川金丝猴的遗传学研究提供了有效的途径。其中线粒体 DNA 控制区 (D-loop) 是线粒体中变异速率最快的区域, 已经被广泛应用于检测珍稀濒危动物的种群遗传结构和系统发育等研究<sup>[9]</sup>。Li 等人测定了来自于 3 个川金丝猴主要栖息地的 18 个样品的部分细胞色素 *b* 序列 (735 bp), 只检测到了 4 个变异位点<sup>[10]</sup>; 类似的结果也出现在 Li 等人利用蛋白质电泳技术对川金丝猴群体的研究中, 分析了来自于 3 个主要栖息地的 32 个样品的 44 个核基因座位, 没有发现任何变异<sup>[11]</sup>; Pan 等人检测了川金丝猴主要栖息地的 32 个样本的 14 个微卫星座位, 虽然均检测到了多态性, 但遗传多样性水平并不高于其他的濒危动物, 因此仍然需要采取有效的遗传保

护措施<sup>[3]</sup>。为了建立适合于川金丝猴研究的非损伤性方法, 并进行川金丝猴种群遗传变异的初步研究, 本研究采用来自甘肃白水江、陕西长青及湖北神农架的川金丝猴粪便样品和自然死亡个体组织样品, 开展了 mDNA D-loop 区部分序列多态性和遗传变异的研究, 以期在川金丝猴种源保存和种群复壮前了解现存种群遗传多态性, 为制定有效保护策略和保护计划提供理论参考。

## 1 材料与方法

**1.1 样品采集和 DNA 提取** 实验采集了 22 份川金丝猴样本, 其中肌肉样品 2 份, 粪便样品 20 份, 包括采自甘肃白水江国家级自然保护区粪便 3 份、陕西长青国家级自然保护区和陕西楼观台野生动物救护中心粪便 5 份及湖北神农架国家级自然保护区肌肉 2 份、粪便 12 份 (图 1)。所有粪便样品保存在含有 12 ml 硅胶的 15 ml 试管中, 室温保存。对于粪便样品采用分子生物学手段进行个体鉴别, 以排除来源于同一个个体的可能。组织 DNA 的提取参照饶刚等<sup>[12]</sup>酚/氯仿抽提 DNA 的方法, 粪便样品 DNA 的提取使用 QIAamp DNA Stool Mini Kit (Germany, Qiagen 公司) 提取试剂盒, 参照厂商提供的说明书进行。

**1.2 mDNA 扩增与目的片段的测定** 参考有关文献<sup>[13]</sup>, 选取引物对 GH (5'-AACTGGCAT TC-TATTTAAACTAC-3') 和 GL (5'-ATTGATTTCACG-GAGGATGGT-3') 对川金丝猴 mDNA D-loop 区进行扩增, 扩增产物大小为 401 bp 左右。PCR 扩增反应体系为 50  $\mu$ l, 含有 1.0 mmol/L 的 dNTP, 1.5  $\times$  PCR buffer, 0.75 U 的 HoMaster<sup>TM</sup> Taq (Eppendorf), 5  $\mu$ g 的 BSA, 1.2 mmol/L 的引物和 5.0  $\mu$ l 模板 DNA。PCR 反应条件为 94 预变性 1 min; 94 变性 15 s, 52 退火 30 s, 72 延伸 1 min, 50 个循环; 最后 72 延伸 2 min。用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 用 PrepEase PCR (USB Corporation, USA) 试剂盒纯

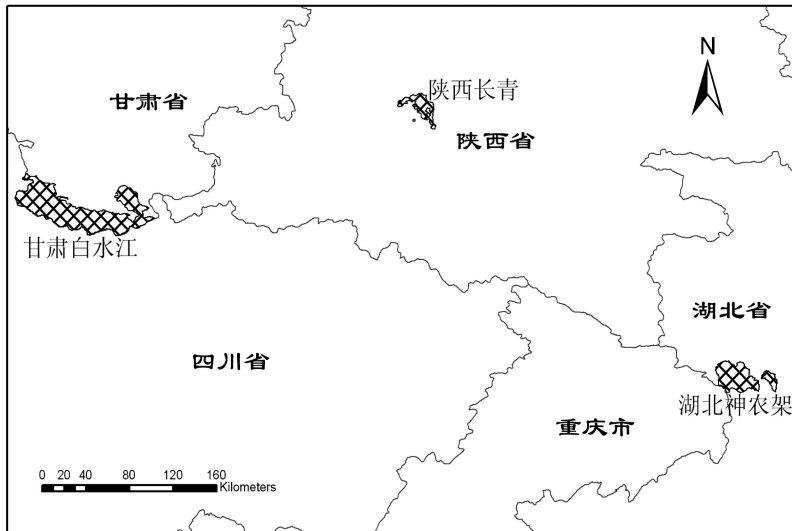


图 1 川金丝猴样品采集地

Fig 1 The sampling sites of the *Rhinopithecus roxellana*

化 PCR 产物, 然后进行测序, 测序由上海生工生物工程技术服务有限公司完成。

**1.3 序列分析** 通过 Sequencher 进行序列分析, 去掉引物和不明晰的片段, 利用 GenBank 中的 BLAST 在数据库中的参照序列进行比对, 根据已有的研究, 比对的结果与数据库中的已知序列同源性在 97% 以上时, 确定该粪便样品与已知序列的物种为相同种。

用 ClustalW 进行序列比对, 并辅以人工校对。应用 DNASP (Version 4.10.8) 软件, 确定单倍型, 计算单倍型间的核苷酸多态性 (nucleotide diversity,  $d$ )、单倍型多态性 (haplotype diversity,  $h$ )。用 MEGA (version 4.0) 软件分析序列的碱基组成、变异位点, 同时基于 Kimura 双参数法计算各单倍型间的遗传距离, 用邻接法 (neighbor joining, NJ) 构建川金丝猴系统发生树, 构建系统树时使用滇金丝猴 (*Rhinopithecus bieti*) 相应的序列 (GenBank 号: DQ661665) 作为外群, 并进行 1 000 次的重抽样 (bootstrap)。

## 2 结果

**2.1 mDNA D-loop 区序列遗传变异分析与单倍型的分布** 从肌肉和粪便样品中, 成功提

取了基因组 DNA 并得到了特异性扩增产物, 经过 Sequencher 分析处理后, 所得到的 mDNA D-loop 序列片段长度为 393 bp。将得到的序列在 GenBank 中比对, 结果发现这 22 个样品的 DNA 序列与数据库中已知川金丝猴序列的差异都小于 3%, 根据 mDNA D-loop 区的高变异特点, 这些序列均来自川金丝猴。22 个川金丝猴样品中, 共检测到 54 个多态位点, 占所研究片段的 13.74%, 包括转换位点 45 个, 颠换位点 9 个, 缺失位点 1 个, 插入位点 1 个, 其中 48、390 号位点既有颠换又有转换。在所有检出的序列中平均 TT 重复 110 次, AA 重复 135 次, CC 重复 87 次, GG 重复 47 次, 其他组合重复次数很少或没有, 平均 A 含量 35.2%, T 含量 29.0%, C 含量 23.3%, G 含量 12.5%, (A + T) % 含量 64.2% 明显高于 (G + C) % 含量 35.8% (图 2)。多态性核苷酸位点分布均匀, 证明所分析的区域属于高变异区。

经过 DNASP 分析, 所有 22 个序列定义了 17 个不同的单倍型 (单倍型序列在 GenBank 数据库中的登录号为: EU825928 ~ EU825944)。分析结果发现, 甘肃白水江自然保护区的 3 个样品分别属于不同的单倍型: BSI1 ~ BSI3, 共有 32 个多态位点, 占所研究片段的 8.14%; 来自

陕西长青的 5个样品发现了 4个单倍型: SH1 ~ SH4,共有 16个多态位点,占所研究片段的 4.1%;湖北神农架自然保护区的 14个样品中

存在 10个不同的单倍型: SNJ1 ~ SNJ10,共有 11个多态位点,占所研究片段的 2.8%。

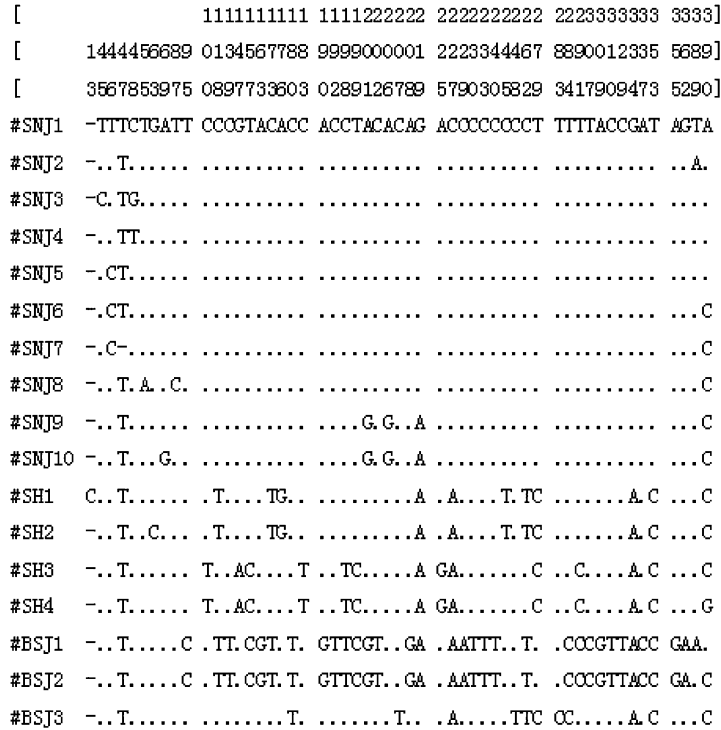


图 2 川金丝猴控制区序列变异位点

Fig 2 Variable sites of mDNA control region of Rhinopithecus roxellana

BSJ1 ~ BSJ3代表甘肃白水江自然保护区的单倍型, SNJ1 ~ SNJ10代表湖北神农架自然保护区的单倍型, SH1 ~ SH4代表陕西的单倍型;上方数字表示单倍型相应碱基位置;圆点表示与第一种单倍型有相同的碱基组成,横线表示缺失。

BSJ1 - BSJ3 represents the haplotypes in Gansu population, SNJ1 - SNJ10 represents the haplotypes in Hubei population, SH1 - SH4 represents the haplotypes in Shanxi population. Above numbers correspond to base positions in haplotypes; a dot indicates identity and a dash indicates a gap relative to the top sequence SNJ1.

2.2 种群遗传多样性与单倍型的系统发生关系

DNASP (Version 4. 10. 8)分析结果表明,在川金丝猴 3个地理单元的 22个样品中,单倍型多态性 (h) 为 0. 965, 核苷酸多态性 ( ) 为 0. 031。在 3个样地中,甘肃白水江种群的 h和 值均为最高,分别是 h为 1. 000, 为 0. 055;其次是陕西长青种群, h为 0. 900, 为 0. 024;最低是湖北神农架种群, h为 0. 890, 为 0. 006。3个样地间核苷酸差异为 0. 62% ~ 5. 24%, 单倍型间平均核苷酸差异数为

12. 035,单倍型间遗传距离 0. 003 ~ 0. 098, 平均遗传距离为 0. 033。

采用 NJ法构建了系统发生树 (图 3),从图 3中可以看出 3个采样地之间的川金丝猴种群存在一定的遗传差异,除 BSJ3外其他种群单倍型各自聚集在一起,相互独立存在。其中神农架川金丝猴种群内亲缘关系最接近,差异最小,而甘肃白水江样品的遗传距离和核苷酸差异要高于其他样地。

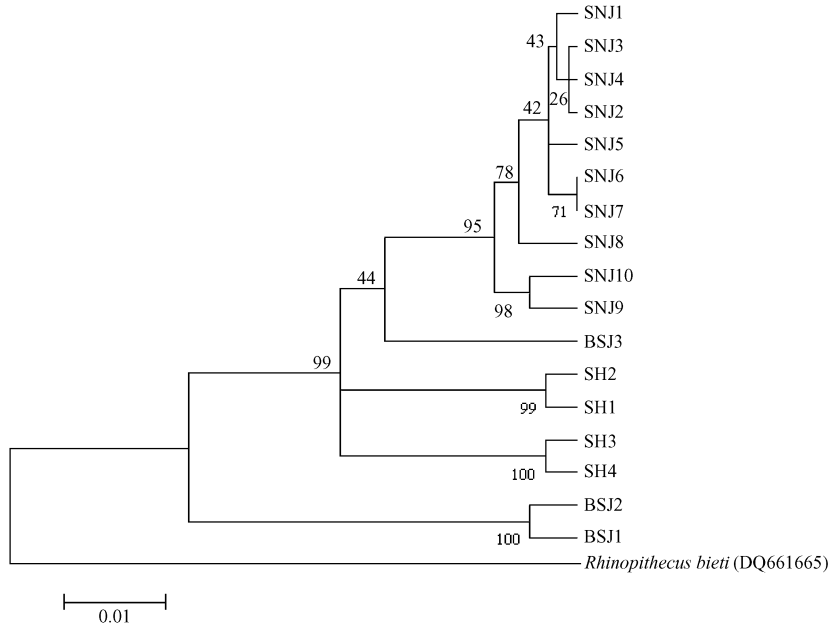


图 3 用邻接法构建的川金丝猴 mDNA D-loop 单倍型系统发生树

Fig 3 Phylogenetic relationship of the Rhinopithecus roxellana mDNA D-loop haplotypes constructed by the neighbor-joining method

以滇金丝猴的同源序列为外群,树枝长度代表遗传距离,树枝处的数字为 Bootstrap 值,重复次数为 1 000 次;BSJ1 ~ BSJ3 代表甘肃白水江自然保护区的单倍型,SNJ1 ~ SNJ10 代表湖北神农架自然保护区的单倍型,SH1 ~ SH4 代表陕西的单倍型。

With *R. bieti* as the outgroup. Branch length indicated the genetic distances Numbers at notes indicated the statistical support obtained from 1 000 bootstrap replicates BSJ1, BSJ2 and BSJ3 represent the haplotypes in Gansu population, SNJ1 - SNJ10 represent the haplotypes in Hubei population, SH1 - SH4 represent the haplotypes in Shaanxi population.

### 3 讨论

川金丝猴栖息在高山森林中,非常警觉,普通的非损伤性取样如采集血液、少量的活体组织等均十分困难。因此,寻找简便安全的 DNA 提取途径对川金丝猴的遗传结构进行分析显得极为重要。与其他材料相比,粪便样品更易收集。近年来国内外许多学者采用了从粪便中提取 DNA 的方法,通过对粪便中多种遗传标记的识别,进行了动物分子遗传学、种群生态学和行为生态学等多方面的研究<sup>[18, 14 - 15]</sup>。本研究基于这种粪便 DNA 分析技术的发展,通过野外收集的 20 份川金丝猴粪便样品,以 2 份肌肉组织样品作为对照,应用 mDNA D-loop 区的特异性引物,成功鉴定并检测了 20 个粪便样品和 2 个肌肉样品的 mDNA D-loop 区部分片段多态性,共检测到 54 个多态性位点,得到 17 个不同的

单倍型,表明所分析的川金丝猴 mDNA D-loop 区存在丰富的遗传多态性。

衡量一个种群 mDNA 的遗传变异有两个重要指标:单倍型间的平均遗传距离 (P) 及核苷酸多态性 (h),由于平均核苷酸多态性考虑了各种 mDNA 单倍型在群体中所占的比例,因此在反映一个群体的 mDNA 多态性程度时比单纯的遗传距离平均值要精确<sup>[9]</sup>。从本研究 3 个不同地理种群总体来看,22 份样本检出 17 个 mDNA 单倍型,单倍型多态 (h) 为 0.965,可见川金丝猴作为珍稀物种,存在着丰富的 mDNA 多态性,与其他濒危灵长类线粒体高变区的多态性水平相比,明显高于滇金丝猴 (h = 0.644)<sup>[16]</sup>和黄山短尾猴 (*Macaca arctoides*, h = 0.559)<sup>[17]</sup>。但衡量群体间遗传多态性的平均核苷酸多态性值却不高 (h = 0.031),据 Neigel 统计<sup>[18]</sup>,哺乳动物个体间平均核苷酸歧异值应

在 0.3% ~ 4% 之间。这种较高的  $h$  值、低  $h_d$  值说明川金丝猴现存种群可能是由一个较小的有效种群迅速增长形成<sup>[19]</sup>, 虽然通过变异积累了单倍型的多态性, 但却未能积累核苷酸序列的多态性<sup>[20]</sup>, 其次这种低核苷酸多态性也可能是由于生境破碎化以及样本量少等多种原因的综合结果。

通过分析 3 个种群之间的遗传距离及核苷酸差异可以看出, 3 个样地之间存在不同程度的遗传差异, 3 个种群之间的遗传距离为 0.003 ~ 0.098, 平均遗传距离为 0.033, 核苷酸差异为 0.08% ~ 2.80%。其中甘肃白水江和湖北神农架之间存在相对最大的遗传距离及核苷酸差异, 这可能是由于甘肃白水江种群在分布上属于岷山山系, 与陕西秦岭和湖北神农架 2 个样地间地理距离相对较远, 存在较少或者根本不存在个体间基因交流, 从而造成一定的遗传分化。同时, 由于甘肃白水江所取样品相对少, 可能在一定程度上影响了数据结果, 这需要今后增加样品进一步验证。湖北神农架种群的遗传距离和核苷酸差异均较甘肃和陕西的低, 这可能与湖北神农架地理分布有关, 神农架地区种群与甘肃岷山、陕西秦岭种群在数量上相比是小种群<sup>[21]</sup>, 这种小种群容易发生遗传漂变, 使得基因频率一代代发生随机性变化, 导致基因结构趋向同质化, 影响种群的进化动力。此外, 小范围繁殖所产生的基因丢失和遗传改变可能在某种程度上导致该样地遗传多样性的降低<sup>[22]</sup>。遗传多样性的缺失会威胁到种群的生存, 因此我们建议加强川金丝猴栖息地保护和修复工作的同时, 对遗传多样性高的甘肃白水江种群和陕西秦岭种群应重点加以保护, 人为建立廊道, 供种群间个体迁移所用, 有计划地恢复一些对基因流有重大影响的栖息地。对于无法恢复或者建立廊道的片断化栖息地, 可以根据等位基因的差异程度, 采用人工引种, 人为地增加种群间的基因交流, 增大物种的遗传多样性。另一方面将神农架种群作为独立的管理单元加以保护, 从不同地理分布不同年龄对神农架群体进行个体补充。

应该指出的是, 本研究中所采集和分析的样品数量有限, 且所分析的 mDNA D-loop 区片段较短。因此, 所代表的种群数量和得到的信息量是有限的, 不能完全代表研究区域实际存在的川金丝猴种群数量和遗传结构, 需要进一步收集更大范围的样品, 同时选用其他 DNA 标记 (如 SSR 等) 对其进一步分析。

**致谢** 感谢甘肃白水江保护区、陕西长青保护区、湖北神农架保护区在本研究样品采集的工作中提供方便条件及大力支持。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] 全国强, 谢家骅. 金丝猴研究. 上海: 上海科技教育出版社, 2002.
- [ 2 ] Li B, An R, Oxnard C E. Extinction of snub-nosed monkeys in China during the past 400 years. *Primate*, 2002, 23 (6): 1227 - 1243.
- [ 3 ] Pan D, Li Y, Hu H X, et al. Microsatellite polymorphisms of Sichuan golden monkeys. *Chinese Science Bulletin*, 2005, 50 (24): 2850 - 2855.
- [ 4 ] David P. Heterozygosity-fitness correlations: new perspectives on old problems. *Heredity*, 1998, 80: 531 - 537.
- [ 5 ] Frankham R. Inbreeding and extinction: island populations. *Conservation Biology*, 1998, 12: 665 - 675.
- [ 6 ] Frankham R, Ballou J D, Briscoe D A. *Introduction to conservation genetics*. Cambridge: Cambridge University Press, 2002, 78 - 104.
- [ 7 ] Schwartz M K, Luikart G, Waples R S. Genetic monitoring as a promising tool for conservation and management. *Trends in Ecology and Evolution*, 2007, 22: 25 - 33.
- [ 8 ] Waits L P, Paetkau D. Noninvasive genetic sampling tools for wildlife biologists: A review of applications and recommendations for accurate data collection. *Wildlife Management*, 2005, 69 (4): 1 - 14.
- [ 9 ] 周慧, 李迪强, 张于光, 等. 藏羚羊 mDNA D-LOOP 区遗传多样性研究. *遗传*, 2006, 28: 299 - 305.
- [ 10 ] Li M, Liang B, Feng Z J. Molecular phylogenetic relationships among Sichuan Snub-nosed Monkeys (*Rhinopithecus roxellanae*) inferred from mitochondrial cytochrome-b gene sequences. *Primates*, 2001, 42 (2): 153 - 160.
- [ 11 ] Li H P, Meng S J, Men Z M. Genetic diversity and population history of golden monkeys (*Rhinopithecus roxellana*). *Genetics*, 2003, 164 (1): 269 - 275.

- [12] 饶刚,李明,牛屹东,等. 陈旧皮张中 DNA 提取的新方法. 动物学杂志, 2001, 36(4): 53 - 57.
- [13] Liu Z J, Ren B P, Wei F W, et al Phylogeography and population structure of the Yunnan snub-nosed monkey (*Rhinopithecus bieti*) inferred from mitochondrial control region DNA sequence analysis Molecular Ecology, 2007, 4: 294 - 300.
- [14] Waits L P. Using non-invasive genetic sampling to detect and estimate abundance of rare wildlife species Molecular Ecology, 2004, 10: 249 - 256.
- [15] Lucchini V, Fabbri E, Marucco F, et al Noninvasive molecular tracking of colonizing wolf (*Canis lupus*) packs in the western Italian Alps Molecular Ecology, 2002, 11: 857 - 868.
- [16] 潘登,符云新,张亚平. 基于线粒体控制区的滇金丝猴群体遗传学研究. 遗传, 2006, 28: 432 - 436.
- [17] 柳杨,李进华,赵健元. 黄山短尾猴 mtDNA 控制区序列变异及种群的遗传多样性. 动物学报, 2006, 52: 724 - 730.
- [18] Neigel J E, Avise J C. Application of a random walk model to geographic distributions of animal mitochondrial DNA variation. Genetics, 1993, 135(4): 1209 - 1220.
- [19] 李明,蒙世杰,魏辅文,等. 羚牛的遗传多样性及其种群遗传结构分析. 兽类学报, 2003, 23(1): 10 - 16.
- [20] Avise J C. Phylogeography the History and Formation of Species Cambridge, Massachusetts London, England: Harvard University Press, 2000.
- [21] Pan D, Hu H X, Meng S J. Population analysis of golden monkey using mitochondrial control region: High level of polymorphism and its implications Chinese Science Bulletin, 2005, 50: 2489 - 2494.
- [22] Pan D, Hu H X, Meng S J, et al A High polymorphism level in *Rhinopithecus roxellana* International Journal of Primatology, 2009, 30(2): 337 - 351.