

青藏高原地区塞隆骨资源的分子鉴定和地理分布

赵芳, 邓小弓, 张同作, 苏建平, 林恭华*

(中国科学院西北高原生物研究所 中国科学院高原生物适应与进化重点实验室, 青海 西宁 810008)

[摘要] 为了提供塞隆骨药材资源地理分布的准确资料, 研究对青藏高原地区的鼯鼠物种进行了分子鉴定。基于线粒体细胞色素 B (*cytb*) 基因测序结果, 提取单倍型序列, 并利用最大似然法 (ML) 和贝叶斯法 (BI) 构建系统发育树, 以此判定每个个体的物种类型。共对 35 个种群的 503 个样品进行了测序, 得到了 1 140 bp 长度的 *cytb* 基因全序列, 从中检测到 150 个单倍型。其中有 20 个单倍型属于甘肃鼯鼠, 有 4 个单倍型属于斯氏鼯鼠构成单系群, 其余 126 个单倍型属于高原鼯鼠。在 35 个种群中, 有 28 个全部为高原鼯鼠, 有 5 个种群全部为甘肃鼯鼠, 另有 2 个种群分别由高原鼯鼠 + 甘肃鼯鼠 (DT2)、高原鼯鼠 + 斯氏鼯鼠 (ZN3) 混合而成。结果表明, 青海湖周边地区和黄河贵德段上游附近地区可以作为塞隆骨药材的正宗来源地, 而利用 *cytb* 基因可以准确鉴定鼯鼠物种, 从而精确判定塞隆骨正宗药材资源的地理分布。

[关键词] 塞隆骨; 鼯鼠; 分子鉴定; 资源分布

Molecular authentication of Sailonggu and its resource distribution in Qinghai-Tibet Plateau

ZHAO Fang, DENG Xiao-gong, ZHANG Tong-zuo, SU Jian-ping, LIN Gong-hua*

(Key Laboratory of Adaptation and Evolution of Plateau Biota, Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810008, China)

[Abstract] To provide accurate information on geographic distribution of crude drug Sailonggu in the plateau, we identified zokor species (*Eospalax* spp.) in Qinghai-Tibet Plateau using molecular methods. Based on the mitochondrial cytochrome B (*cytb*) gene sequences, we then extracted haplotypes from these sequences and reconstructed phylogenetic trees for the haplotypes using both maximum likelihood (ML) and Bayesian inference (BI) methods. Based on the trees, the species of each sample were determined. Five hundred and three samples from 35 populations were sequenced and their whole *cytb* sequences (1 140 bp) were obtained. From these sequences 150 haplotypes were detected, in which, 126 were *Eospalax baileyi*, 20 were *E. cansus*, and 4 were *E. smithi* of the 35 populations, 28 were *E. baileyi* type, 5 were *E. cansus* type, and the remaining 2 were mixed of *E. baileyi* + *E. cansus* (DT2) and *E. baileyi* + *E. smithi* (ZN3). The results showed that, the regions around the Qinghai lake and near the upper stream of Yellow River started at Guide could be viewed as the producing area of authentic Sailonggu, and also, the *cytb* gene is a powerful molecular marker to determine the species of zokors as well as for the authentication of geographic distribution of Sailonggu.

[Key words] Sailonggu; zokor; molecular authentication; resource distribution

doi: 10.4268/cjmm20150306

塞隆骨是鼯形鼠科 Spalacidae 鼯鼠亚科 Myospalacinae 高原鼯鼠 *Eospalax baileyi* 的干燥全骨

架^[1] 是国家一类动物新药材。塞隆骨性微温、味辛咸, 入肝肾经, 主要功能为祛风除湿散寒、舒筋活

[收稿日期] 2014-07-12

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金项目 (31101628)

[通信作者] * 林恭华, 博士, 主要从事动物学研究, Tel: 15909717366, E-mail: lingonghua@nwipb.cas.cn

[作者简介] 赵芳, 博士研究生, 主要从事动物学研究, Tel: 18397102818, E-mail: zf_lgh@163.com

络、强筋健骨及增强机体抵抗力,其药理学作用与传统名贵中药材虎骨类似^[2-4],是目前较理想的虎骨代用品。但是药酒厂在收购塞隆骨时,发现商品中有其他动物骨骼混淆的现象,而现有的鉴别方法准确性、实用性差。尤其是当与鼯鼠属其他物种相混淆时,由于这类动物对地下生活方式的趋同性适应,种间区分难度较大,对专业水平和经验的要求极高^[5-6]。

随着分子生物学的发展,以DNA分子为标记鉴定动植物药材,正在发挥越来越重要的作用^[7]。曹晖等^[8]对高原鼯鼠18S rRNA序列进行扩增测序,结果显示,此分子标记可有效避免高原鼯鼠与小家鼠 *Mus musculus* 和褐家鼠 *Rattus norvegicus* 混淆。Zhou等^[9]进一步利用线粒体12S rRNA和cytochrome b(*cytb*)基因对鼯鼠属多个物种进行比较,结果表明,这2个基因标记可以有效鉴别塞隆骨(高原鼯鼠),而避免与其近缘物种甘肃鼯鼠 *E. cansus*、罗氏鼯鼠 *E. rothschildi*、秦岭鼯鼠 *E. rufescens*、中华鼯鼠 *E. fontanieri* 等相混淆。其中,基于*cytb*基因构建的系统树支持率更高,其鉴定可靠性优于12S rRNA基因。

青藏高原是高原鼯鼠的特有分布区,之前的研究已经大致划定这一物种的分布范围^[5]。值得一提的是,这种划分精度不高,在实际采集过程中容易产生混淆。例如,资料中提到青海省大通县属于高原鼯鼠分布区^[5],然而作者之前的研究显示,大通县小寺村采集的样品属于甘肃鼯鼠^[10]。研究同时显示,在湟水河流域的许多地区,都属于甘肃鼯鼠的分布范围。这些区域往往是捕鼠人员的居住地,许多捕捉和收购鼯鼠的活动在此进行。这就不可避免会产生不同鼯鼠材料的混淆,严重影响塞隆骨药材的道地性。笔者所在的研究组长期从事鼯鼠进化生态学研究,收集了青藏高原及周边地区大量的鼯鼠样品,对每一个采集地都进行了GPS定位。本研究利用这些鼯鼠样品,以*cytb*基因为遗传标记,对青藏高原地区的鼯鼠物种进行分子鉴定,为塞隆骨药材资源的地理分布提供准确的基础资料。

1 材料

于2008—2012年用地箭捕捉鼯鼠,解剖后取大腿肌肉样品,用95%乙醇固定。记录采集地经纬度、海拔等信息。从35个采样点中共采集503份鼯鼠个体,涉及青海、甘肃、四川3省,具体采样信息及

地理分布见表1。试剂包括动物组织DNA提取试剂盒(上海生工),*Taq*酶及PCR缓冲液(含 Mg^{2+})(全式金),超纯水(自制)等。

2 方法

2.1 DNA提取、PCR扩增与测序 取肌肉0.1g左右,置于灭菌玻璃板上切碎,按照试剂盒说明书步骤提取基因组总DNA。*Cytb*基因的PCR扩增在Tgradient Thermocycler(Biometra)上进行,参数设置为:95℃条件下预变性3min;95℃变性45s,54℃退火45s,72℃延伸1.5min,34次循环;最后72℃续延伸7min。反应体系为50μL,内含200mmol·L⁻¹dNTP,每条引物0.2mmol·L⁻¹,1U*Taq*酶及1μL DNA样本。正向引物L14724(5'-CGAAGCTT-GATATGAAAACCATCGTTG-3'),反向引物H15917(5'-CGGAATTCCATTTTTGTTTACAAG-3')。扩增产物直接送上海生工进行测序,测序仪型号为ABI 3730 DNA Analysis System(Applied Biosystems, USA)。

2.2 数据处理 测序数据经Chromas软件输出后,用Clustal X软件^[11]的默认参数设置进行同源排序,并实施人工校对,最终得到可用序列以供进一步分析。以DnaSP v5软件^[12]统计序列变异位点信息,并输出单倍型和遗传多样性信息。

系统发生关系用最大似然法(maximum likelihood, ML)和贝叶斯法(Bayesian inference, BI),分别用Phyml 3.1软件^[13]和MrBayes 3.2.2软件^[14]进行。在构建系统树之前,先用jModeltest软件^[15]对所有单倍型序列进行模型测试,以Akaike information criterion(AIC)指数为指标,获得最适模型及相应的统计学参数。对ML法的分枝置信度进行100次Bootstrap自举检验;而对于BI法则设置2百万代(generations),保证其分裂频率标准偏差(standard deviation of split frequencies)小于0.01。构建系统树时,以平颅鼯鼠属的东北鼯鼠 *Myospalax psilurus* 作为外类群。同时,作者从GenBank下载已进行物种鉴定的凸颅鼯鼠序列^[6]参与建树,用以判定本研究所测序列的物种属性。值得一提的是,这些已知序列中有部分两两之间完全相同,本研究仅随机保留其中1条。

3 结果与讨论

对503个样品进行测序,得到1140bp长度的*cytb*基因全序列。共检测到311个变异位点,总体

表1 采样点、样本量及单倍型分布信息

Table 1 Sampling sites, sample size, and haplotype distribution of zokors

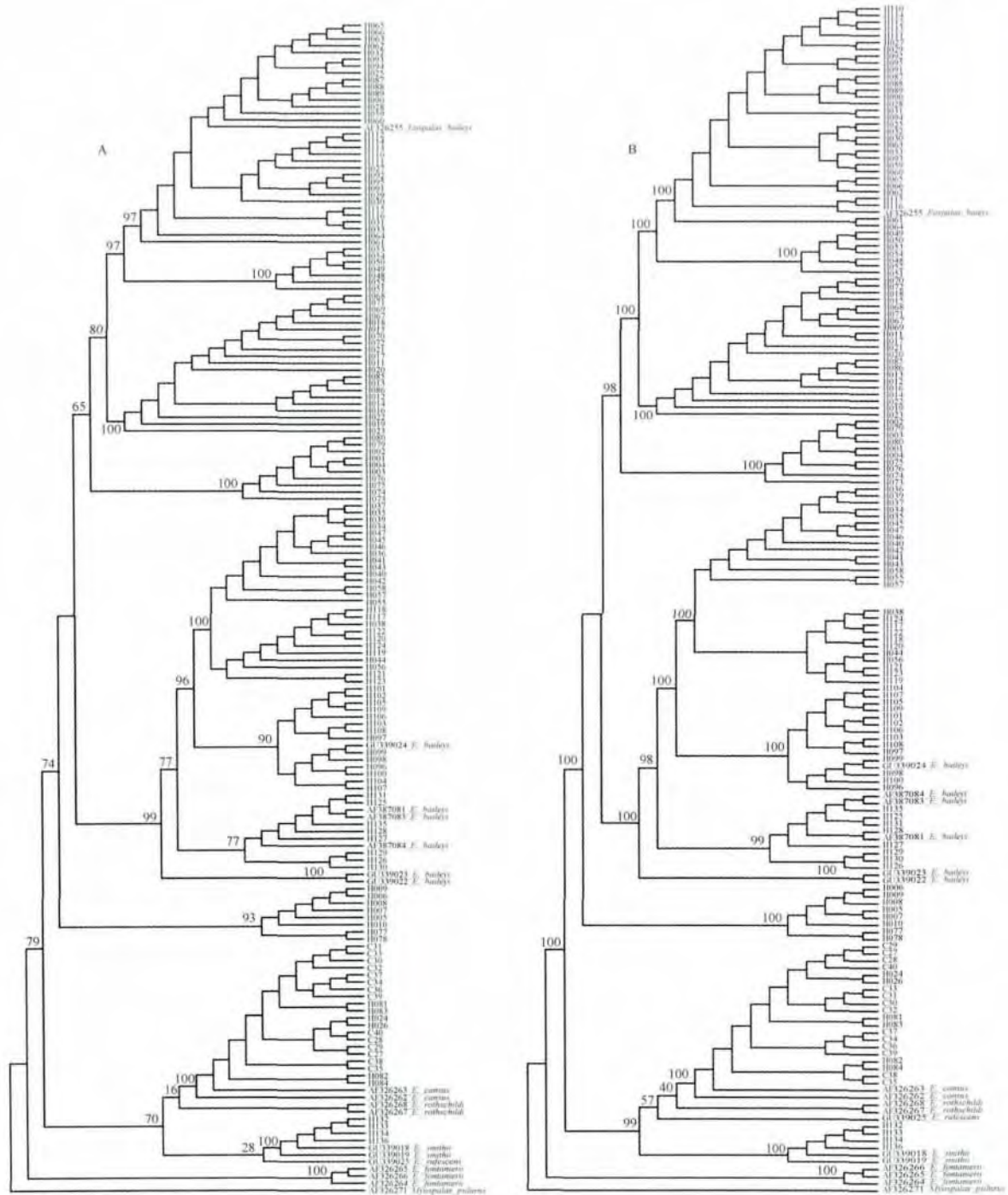
地点	简称	经度	纬度	海拔/m	样本量	单倍型	物种
青海省班玛县多贡麻乡	BM	100°33'49.932"	33°7'28.308"	3 705	14	H1-H4	Eb
青海省称多县珍秦乡	CD1	97°14'7.404"	33°21'12.816"	4 390	13	H5	Eb
青海省称多县歇武镇	CD2	97°28'21.792"	33°12'5.508"	4 450	14	H6-H9	Eb
青海省称多县清水河镇	CD3	96°56'37.392"	33°46'10.704"	4 550	14	H10	Eb
青海省大通县向化乡	DT1	101°47'20.688"	37°9'7.308"	2 988	19	H11-H23	Eb
青海省大通县黄家寨镇	DT2	101°43'3.972"	36°50'29.148"	2 393	7	H24-H26	Eb + Ec
青海省刚察县泉吉乡	GC	99°42'41.400"	37°10'9.408"	3 235	14	H27-H29	Eb
青海省贵德县尕让乡	GD	101°33'14.112"	36°17'57.732"	3 119	11	H30-H33	Eb
青海省共和县石乃亥乡	GH	99°44'5.928"	37°2'1.752"	3 209	14	H27	Eb
青海省贵南县过马营镇	GN1	101°4'8.868"	35°46'32.088"	3 255	17	H34-H39	Eb
青海省贵南县塔秀乡	GN2	100°27'42.588"	35°34'38.568"	3 306	19	H40-H44	Eb
青海省贵南县过马营镇	GN3	101°18'4.392"	35°46'2.820"	3 302	12	H36 ,H45-H47	Eb
青海省化隆县巴燕镇	HL	102°17'49.668"	36°11'18.528"	3 185	14	H48-H54	Eb
青海省河南县优干宁镇	HN	101°33'35.172"	34°46'29.568"	3 552	14	H55-H58	Eb
青海省湟源县大华乡	HY	101°4'41.412"	36°39'16.560"	3 043	16	H30 ,H59-H66	Eb
青海省互助县松多乡	HZ1	102°11'47.328"	36°42'14.148"	2 880	10	C27-C29	Ec
青海省互助县巴扎乡	HZ2	102°15'21.600"	37°2'7.260"	2 857	15	H67-H72	Eb
青海省久治县智青松多镇	JZ1	101°29'29.580"	33°15'35.568"	3 741	17	H73-H76	Eb
青海省久治县索呼日麻乡	JZ2	100°49'19.632"	33°36'17.892"	3 847	14	H77-H80	Eb
青海省乐都县下北山林场	LD	102°38'15.288"	36°34'54.588"	3 000	11	C30-C33	Ec
青海省民和县满坪镇	MH1	102°43'40.188"	36°2'54.492"	2 670	11	C34-C38	Ec
青海省民和县川口镇	MH2	102°49'16.248"	36°15'30.240"	2 313	13	H81-H84	Ec
青海省门源县东川镇	MY	101°49'31.620"	37°19'24.528"	2 715	15	H85-H86	Eb
青海省平安县寺台乡	PA	101°58'2.064"	36°22'27.480"	2 750	11	C39-C40	Ec
青海省祁连县八宝镇	QL1	100°11'35.340"	38°6'14.688"	3 213	14	H87-H90	Eb
青海省祁连县默勒镇	QL2	100°31'31.872"	37°39'34.488"	3 566	16	H27 ,H91-H95	Eb
四川省若尔盖县阿西乡	REG2	102°53'24.000"	33°54'53.496"	3 450	14	H96-H100	Eb
四川省若尔盖县唐克乡	REG3	102°31'59.916"	33°24'36.900"	3 490	15	H101-H102	Eb
四川省若尔盖县红星乡	REG4	102°43'16.608"	34°6'11.088"	3 240	12	H103-H109	Eb
青海省天峻县关角乡	TJ	98°52'15.492"	37°10'46.704"	3 840	14	H110-H114	Eb
青海省兴海县河卡镇	XH	99°55'7.320"	35°51'10.728"	3 566	14	H115-H116	Eb
青海省泽库县巴滩牧场	ZK	100°57'42.192"	35°14'15.540"	3 428	25	H38 ,H117-H124	Eb
甘肃省卓尼县啊子滩乡	ZN1	103°14'49.740"	34°44'58.632"	3 160	23	H125	Eb
甘肃省卓尼县完冒乡	ZN2	103°3'8.352"	34°22'2.532"	3 270	12	H125 ,H126-H131	Eb
甘肃省卓尼县申藏乡	ZN3	103°33'6.984"	34°44'21.444"	3 020	15	H125 ,H132-H136	Eb + Es

注: Eb. 高原鼯鼠; Ec. 甘肃鼯鼠; Es. 斯氏鼯鼠。

单倍型多样性 ($H_d \pm SD$) 为 0.986 ± 0.001 , 核苷酸多样性 ($P_i \pm SD$) 为 0.06238 ± 0.00123 。从 503 个序列中共检测到 150 个单倍型, 其中有 5 个单倍型在 2 ~ 3 个种群之间共享 (H27, H30, H36, H38, H125)。各种群的单倍型组成在表 1 中列出, 其中 H1 ~ H136 对应 GenBank 号 KM103774 ~ KM103909, C27 ~ C40 对应 GenBank 号 GQ244389 ~ GQ244402。

系统发育分析显示, ML, BI 这 2 种方法得到系统树的结构非常相似。结果表明, 有 20 个单

倍型 (C27 ~ C40, H024, H026, H081 ~ H084) 与现有甘肃鼯鼠形成单系群, 有 4 个单倍型 (H132 ~ H134, H136) 与斯氏鼯鼠构成单系群, 其余 126 个单倍型 (84%) 与已知高原鼯鼠序列形成单系群, 见图 1。基于系统树和单倍型分布特征可以判定, HZ1, LD, MH1, MH2, PA 种群中所有个体都是甘肃鼯鼠, DT2 种群中同时具有甘肃鼯鼠和高原鼯鼠个体, ZN3 种群中同时具有高原鼯鼠和斯氏鼯鼠个体, 其他 28 个种群中所有个体都为高原鼯鼠 (表 1)。



A. 最大似然树; B. 贝叶斯树。

图1 基于单倍型构建的系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic trees based on zokor *cytb* haplotypes

本研究显示,青藏高原地区绝大多数种群都由高原鼯鼠组成,同时还有部分地区为甘肃鼯鼠、高原鼯鼠+甘肃鼯鼠、高原鼯鼠+斯氏鼯鼠种群。从分

布区域上看,湟水河流域是甘肃鼯鼠的主要分布区,与多个高原鼯鼠分布区域接壤,最容易导致混淆。同时,县域并非判定鼯鼠物种的良好指标,如大通县

和互助县分别都有高原鼯鼠和甘肃鼯鼠 2 个物种分布,而卓尼县则有高原鼯鼠和斯氏鼯鼠 2 个物种分布。从海拔上看,3 100 m 以上区域只有高原鼯鼠分布,可以作为相对准确的判断标准,而 3 100 m 以下地区则 3 种鼯鼠都可能分布,不能作为判定依据。

之前的研究表明,鼯鼠属的物种进化过程具有异域发生的特点,称多地区(CD1 ~ CD3)是迄今为止发现的高原鼯鼠最古老类群,之后向北向东扩散、分化^[16]。而甘肃鼯鼠的古老类群则在陕西北部地区,之后向西扩展^[10],最后在青藏高原和黄土高原交汇的湟水河谷与高原鼯鼠汇合。斯氏鼯鼠的模式产地在甘肃省临潭县^[6],作者推测,本研究的 ZN3 种群也是斯氏鼯鼠向高原扩散并与高原鼯鼠汇合的地点。总体来看,青海湖地区和黄河贵德段上游地区可以保证都是高原鼯鼠。本研究表明,利用 *cytb* 鉴定鼯鼠种类完全可行,为保证塞隆骨药材的正宗性,建议利用此标记进行分子鉴定。

[参考文献]

- [1] 谢宗万,余友琴. 全国中草药名鉴[M]. 北京: 人民卫生出版社,1996.
- [2] 张宝琛. 塞隆骨代虎骨具有重要开发前景[J]. 中国中医药信息杂志,1996,3(7): 381.
- [3] 潘明,石珏,罗霞,等. 塞隆骨提取物对成骨样细胞增殖及凋亡作用的研究[J]. 中国中药杂志,2006,31(23): 1991.
- [4] 赵晓辉,岳会兰,梅丽娟,等. 塞隆骨提取物对牛 II 型胶原诱导的小鼠关节炎的治疗作用及机制研究[J]. 中国药理学通报,2008,24(3): 395.
- [5] 樊乃昌,施银柱. 中国鼯鼠(*Eospalax*)亚属分类研究[J]. 兽类学报,1982,2(2): 183.
- [6] 何娅,周材权,刘国库,等. 斯氏鼯鼠物种地位有效性的探讨[J]. 动物分类学报,2012,37(1): 36.
- [7] 陈士林,郭宝林,张贵君,等. 中药鉴定学新技术新方法研究进展[J]. 中国中药杂志,2012,37(8): 1043.
- [8] 曹晖,张绍来,周开亚. 塞隆骨原动物高原鼯鼠核基因 18SrRNA 序列测定与分析[J]. 中国中药杂志,2001,26(2): 90.
- [9] Zhou C, Zhou K, Zhang S. Molecular authentication of the animal crude drug Sailonggu (bone of *Myospalax baileyi*) [J]. Biol Pharm Bull, 2004, 27(11): 1850.
- [10] 林恭华. 地下啮齿类——甘肃鼯鼠挖掘器官形态适应与种群遗传学分析[D]. 北京: 中国科学院, 2010.
- [11] Thompson J D, Higgins D G, Gibson T J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice [J]. Nucleic Acids Res, 1994, 22(22): 4673.
- [12] Rozas J, Sánchez-Del Barrio J C, Messeguer X, et al. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods [J]. Bioinformatics, 2003, 19(18): 2496.
- [13] Guindon S, Dufayard J F, Lefort V, et al. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0 [J]. Syst Biol, 2010, 59(3): 307.
- [14] Ronquist F, Huelsenbeck J P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models [J]. Bioinformatics, 2003, 19(12): 1572.
- [15] Darriba D, Taboada G L, Doallo R, et al. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing [J]. Nat Methods, 2012, 9(8): 772.
- [16] Tang L Z, Wang L Y, Cai Z Y, et al. Allopatric divergence and phylogeographic structure of the plateau zokor (*Eospalax baileyi*), a fossorial rodent endemic to the Qinghai-Tibetan Plateau [J]. J Biogeogr, 2010, 37(4): 657.

[责任编辑 吕冬梅]