

# 青藏高原东部地区田鼠物种的分子鉴定

赵贤贤<sup>1,2</sup> 李邦<sup>1</sup> 林恭华<sup>1,3</sup> 马万军<sup>4</sup> 巨海兰<sup>5</sup> 苏建平<sup>1,3</sup> 张同作<sup>1,3\*</sup>

(1 中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810001) (2 中国科学院大学, 北京 100049) (3 青海省动物生态基因组学重点实验室, 西宁 810001)  
(4 青海省野生动物疫源疫病监测总站, 西宁 810007) (5 大通县森林病虫害防治检疫站, 大通 810100)

**摘要:** 以线粒体细胞色素 *b* 基因序列 (Cyt *b*) 为分子标记, 结合系统发育分析 (最大似然法和贝叶斯法) 和遗传距离统计 (JC 遗传距离模型) 等方法, 分析青藏高原东部地区田鼠类动物的物种组成和地理分布特征。从 16 个样点共采集到 189 个田鼠样品, 成功获得所有个体的 Cyt *b* 全序列, 长度为 1 143 bp, 共检测到 248 个变异位点和 65 个单倍型。系统发育分析显示, 最大似然树和贝叶斯树的结构基本一致, 将 65 个单倍型分为 3 组 (G1–G3), 分别与已知的柴达木根田鼠 (*Microtus limnophilus*)、青海松田鼠 (*Neodon fuscus*) 和高原松田鼠 (*N. irene*) 聚为单系群, 支持率都为 100%。遗传距离统计显示, G1、G2、G3 组内两两单倍型之间的遗传距离范围分别为 0.09%–3.04%、0.09%–0.70%、0.18%–1.95%; 同时, G1 与柴达木根田鼠参考序列之间、G2 与青海松田鼠参考序列之间、G3 与高原松田鼠参考序列之间遗传距离范围分别为 0.61%–2.49%、0.53%–0.97%、1.77%–2.22%。结合系统发育和遗传距离分析结果, 本研究中采集到的田鼠个体可以鉴定为 3 个物种: 柴达木根田鼠 ( $n=135$ )、青海松田鼠 ( $n=30$ ) 和高原松田鼠 ( $n=24$ )。其中, 柴达木根田鼠分布最广 (10 个地点), 青海松田鼠 (4 个地点) 和高原松田鼠 (3 个地点) 的分布区则相对狭小; 3 种动物在分布区上重叠度很小, 仅河南县同时发现有柴达木根田鼠和青海松田鼠分布。研究表明, 青藏高原东部地区至少有 3 种田鼠分布, 种间遗传界限清晰, 空间分布具有一定规律性。研究结果为了解青藏高原东部地区田鼠类动物的物种分布提供可靠的基础资料, 同时为这一地区的田鼠类动物的分子鉴定方法提供参考。

**关键词:** 田鼠; 分子鉴定; 青藏高原; 系统发育; 遗传距离

中图分类号: Q959.837; Q346

文献标识码: A

文章编号: 1000–1050 (2017) 01–0044–09

## Molecular identification of voles in the east of the Qinghai–Tibet Plateau

ZHAO Xianxian<sup>1,2</sup>, LI Bang<sup>1</sup>, LIN Gonghua<sup>1,3</sup>, MA Wanjun<sup>4</sup>, JU Hailan<sup>5</sup>, SU Jianping<sup>1,3</sup>, ZHANG Tongzuo<sup>1,3\*</sup>

(1 Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, China)

(2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

(3 Qinghai Key Laboratory of Animal Ecological Genomics, Xining 810001, China)

(4 Central Station of Epidemic Disease Monitoring of Terrestrial Wildlife in Qinghai, Xining 810007, China)

(5 Forest Pest Management and Quarantine Station of Datong County in Qinghai, Datong 810100, China)

**Abstract:** Using mitochondrial cytochrome *b* gene (Cyt *b*) as a molecular marker combined with phylogenetic methods (Maximum Likelihood and Bayesian Inference) and genetic distance statistics (Jukes and Cantor's distance), we analyzed the species composition and geographical distribution of voles in the east of the Qinghai–Tibet Plateau. We sampled 189 voles from 16 localities and sequenced the complete Cyt *b* sequences (1 143 bp) of these individuals. A total of 248 variable sites and 65 haplotypes were detected. The topology of Maximum Likelihood and Bayesian Inference trees were basically consistent, clustering the 65 haplotypes into three groups (G1–G3), respectively forming three monophyletic groups with known *Microtus limnophilus*, *Neodon fuscus* and *N. irene*, and with very high bootstrap support values (100%). The haplotype based pairwise genetic distances within G1, G2, G3 were respectively 0.09%–3.04%, 0.09%–0.70% and 0.18%–1.95%; while between G1 and *M. limnophilus*, between G2 and *N. fuscus* and between G3 and *N. irene* were 0.61%–2.49%, 0.53%–0.97% and 1.77%–2.22%, respectively. Based on phylogenetic and genetic distance analyses, these voles were identified as three species: *M. limnophilus* ( $n=135$ ), *N. fuscus* ( $n=30$ ) and *N. irene* ( $n=24$ ). *M. limnophilus* was most widely distributed (10 localities) while *N. fuscus* (4 localities) and *N. irene* (3 localities) were confined to small ranges. The overlapping areas of these three species was small. Only one locality (HN) was inhabited by

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31370405); 青海省科技支撑计划项目 (2014–NS–113, 2014–NS–118)

作者简介: 赵贤贤 (1990–), 女, 硕士研究生, 主要从事动物生态学研究。

收稿日期: 2016–01–08; 修回日期: 2016–07–28

\* 通讯作者, Corresponding author, E-mail: zhangtz@nwipb.cas.cn

*M. limnophilus* and *N. fuscus* at the same time. Our results showed that there were at least three vole species distributed in the study regions. They were well defined by molecular marker and had certain regularity in the geographical distribution patterns. Our results provide fundamental information of vole distribution in the east of the Qinghai-Tibet Plateau as well as an example for molecular identification of rodents in the study regions.

**Key words:** Genetic distance; Molecular identification; Phylogenetics; Qinghai-Tibet Plateau; Vole

田鼠类动物 (voles) 属于仓鼠科 (Cricetidae) 鼯亚科 (Arvicolinae), 广布于北半球的苔原、森林、干草原等地, 是全北区小哺乳动物中的优势类群 (Shenbrot and Krasnov, 2005)。长期以来, 田鼠的物种鉴定主要通过形态学方法进行, 其外形特征、骨骼形态 (尤其是颊齿的形态) 是鉴别田鼠类物种的重要参数。然而, 形态鉴定方法需要采集和测量较完整的动物标本 (如头骨样品), 且要求分类人员具有一定的动物分类知识和鉴定技能。近年来, 随着分子生物学技术不断进步, 分子鉴定方法已经成为重要的物种分类鉴定手段 (Hebert *et al.*, 2003)。普通科技人员利用分子标记进行物种鉴定, 可以减少对动物标本完好程度和分类经验的依赖。

青藏高原是我国生物多样性最丰富的地区之一。由于环境条件恶劣, 与低海拔地区相比, 人们对这一地区的田鼠类动物的了解相对较少。当前, 主要有动物志等的文献对青藏高原地区的田鼠进行描述 (中国科学院西北高原生物研究所, 1989; 罗泽珣等, 2000; 王应祥等, 2003; 黄薇等, 2008; 张继军等, 2008; Smith 和谢炎, 2009; 蒋志刚等, 2015), 认为这一地区至少有 20 多种田鼠

类动物分布。然而, 由于历史原因, 现有的文献资料对有些田鼠物种的分类地位和种名使用方面众说纷纭 (见本文讨论部分)。同时, 由于原始的研究资料尤其是标本保存及采样点信息匮乏, 人们对这一地区田鼠类的分布特征也缺乏了解。利用分子系统学方法厘清分类学方面的争议, 同时结合新的物种分布信息, 有助于加深对这一地区动物区系特征的了解, 并切实提高实地工作 (鼠害防治、地方病调查、生态学研究等) 中物种判定的准确性。本研究采用分子生物学手段, 对青藏高原东部地区田鼠类动物进行物种鉴定, 为了解青藏高原地区田鼠的物种组成和分布特征提供基础资料; 同时, 为这一地区田鼠类动物的分子鉴定提供参考。

## 1 研究方法

### 1.1 样品采集

本研究所有的样品均为 2012 年至 2013 年间在青藏高原东部获得, 一共 16 个采样点, 覆盖了青藏高原东部大部分地区 (图 1, 表 1)。以夹捕法捕捉田鼠, 共采集 189 只个体, 剪取小腿肌肉, 保存于无水乙醇中。

表 1 本研究田鼠采样点和单倍型分布信息

Table 1 Location of samples and haplotypes included in the present study

地点 Location	ID	<i>n</i>	经度 (°E) Longitude	纬度 (°N) Latitude	海拔 Altitude (m)	物种 Species	单倍型 Haplotypes
临夏 Linxia	LX	12	102.87	35.55	2512	<i>M. limnophilus</i>	H25 (1), H36 (8), H37 (1), H38 (2)
大通 Datong	DT	14	101.26	37.14	3086	<i>M. limnophilus</i>	H47 (1), H48 (1), H49 (8), H50 (2), H51 (1), H52 (1)
祁连 Qilian	QL	13	100.19	38.12	3135	<i>N. irene</i>	H46 (13)
门源 Menyuan	MY	15	101.32	37.61	3212	<i>M. limnophilus</i>	H12 (1), H13 (1), H14 (10), H15 (1), H16 (1), H17 (1)
香日德 Xiangride	XRD	14	98.02	35.90	3221	<i>M. limnophilus</i>	H62 (13), H63 (1)
刚察 Gangcha	GC	13	100.12	37.28	3259	<i>M. limnophilus</i>	H53 (7), H54 (1), H55 (2), H56 (2), H57 (1)
贵南 Guinan	GN	6	101.23	35.78	3303	<i>N. irene</i>	H10 (1), H11 (5)

续表 1 Continued from table 1

地点 Location	ID	<i>n</i>	经度 (°E) Longitude	纬度 (°N) Latitude	海拔 Altitude ( m)	物种 Species	单倍型 Haplotypes
贵德 Guide	GD	5	101.01	35.51	3304	<i>N. irene</i>	H6 ( 1 ) , H7 ( 1 ) , H8 ( 2 ) , H9 ( 1 )
化隆 Hualong	HL	14	102.31	36.20	3357	<i>M. limnophilus</i>	H18 ( 12 ) , H19 ( 2 )
河南 Henan	HN	13	101.40	34.64	3477	12 <i>M. limnophilus</i> , 1 <i>N. fuscus</i>	H20 ( 1 ) , H21 ( 3 ) , H22 ( 3 ) , H23 ( 2 ) , H24 ( 1 ) , H25 ( 1 ) , H26 ( 1 ) , H27 ( 1 )
泽库 Zeku	ZK	13	101.19	35.29	3509	<i>M. limnophilus</i>	H64 ( 1 ) , H65 ( 12 )
玛曲 Maqu	MQ	13	102.03	34.01	3559	<i>M. limnophilus</i>	H26 ( 4 ) , H39 ( 1 ) , H40 ( 3 ) , H41 ( 1 ) , H42 ( 1 ) , H43 ( 1 ) , H44 ( 1 ) , H45 ( 1 )
同德 Tongde	TD	8	100.22	34.24	3645	<i>N. fuscus</i>	H58 ( 7 ) , H59 ( 1 )
久治 Jiuzhi	JZ	15	101.50	33.37	3650	<i>M. limnophilus</i>	H28 ( 1 ) , H29 ( 1 ) , H30 ( 4 ) , H31 ( 2 ) , H32 ( 1 ) , H33 ( 2 ) , H34 ( 3 ) , H35 ( 1 )
兴海 Xinghai	XH	13	99.65	35.90	3886	<i>N. fuscus</i>	H60 ( 12 ) , H61 ( 1 )
达日 Dari	DR	8	99.07	33.96	4113	<i>N. fuscus</i>	H1 ( 2 ) , H2 ( 1 ) , H3 ( 3 ) , H4 ( 1 ) , H5 ( 1 )

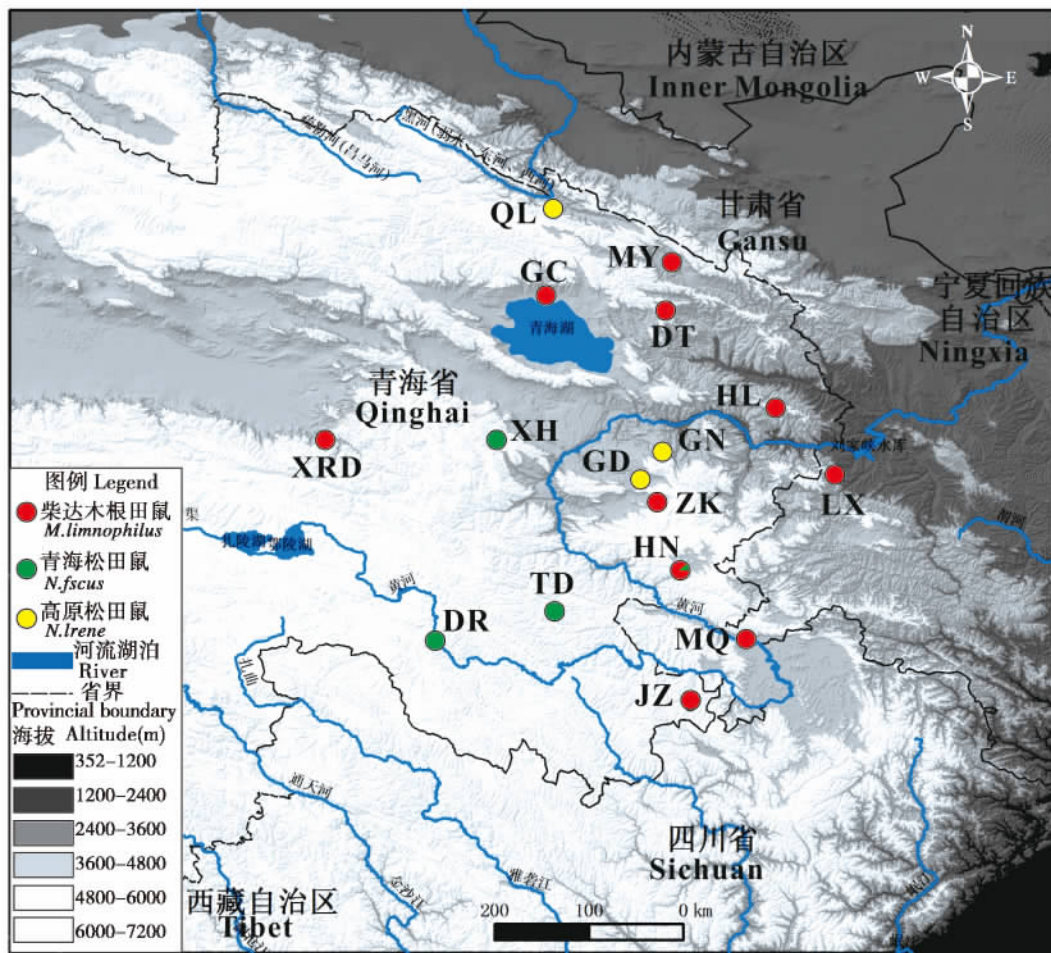


图 1 田鼠类动物采样点分布图 ( HN 兼有柴达木根田鼠和青海松田鼠)

Fig. 1 Sample sites for voles ( both *M. limnophilus* and *N. fuscus* were sampled in HN)

## 1.2 总 DNA 提取

取适量肌肉样品, 剪碎并置于 1.5 mL 已灭菌的离心管中, 用上海生工 Ezup 动物基因组抽提试剂盒提取总 DNA。所有提取出的 DNA 样品经过 Nano Drop 分光光度计检验, 稀释至 DNA 溶液的浓度为 10–20 ng/ $\mu$ L 之间, 稀释后的 DNA 溶液放置在  $-20^{\circ}\text{C}$  长期保存。

## 1.3 扩增与测序

Cyt *b* 序列用通用引物 L14724B (5' – CGAGATCTGAAAAACCATCGTTG – 3') / H15915 (5' – AACTGCAGTCATCTCCGGTTTACAAGAC – 3') 和 L14727 – SP (5' – GACAGGAAAAATCATC GTTG – 3') / H15915 – SP (5' – TTCATTACTGGT TTACAAGAC – 3') (Irwin *et al.*, 1991) 进行扩增。PCR 反应体系为: 1  $\mu$ L 总 DNA 溶液, 5  $\mu$ L 10  $\times$  EasyTaq buffer (Mg<sup>2+</sup> plus), 1.25 mmol/L dNTPs, 2.5 U EasyTaq<sup>®</sup> DNA 聚合酶, 正向和反向

引物各 10  $\mu$ mol/L, 总反应体积为 40  $\mu$ L。PCR 反应程序: 95 $^{\circ}\text{C}$  预变性 4 min, 94 $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s, 51 $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min 30 s, 从变性到延伸循环 36 次, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$  充分延伸 7 min。所有扩增产物经过 1% 琼脂糖凝胶电泳检验, 确认有目的条带, 并邮寄至生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行 Sanger 测序 (3730 测序仪双向测序)。

## 1.4 数据分析

所有得到的测序峰图用 Chromas 软件 (Chroma Technology Corporation) 输出序列, 在 MEGA (Tamura *et al.*, 2011) 中进行同源排序, 并手工比对、拼接。利用 DNasp 软件 (Librado and Rozas, 2009) 统计序列的变异位点, 同时生成单倍型序列数据。从 GenBank 中下载已测田鼠的 Cyt *b* 基因序列 (GenBank 号见表 2), 并且以黑线仓鼠 (*Cricetulus griseus*) 为外群, 与上述单倍型序列合并后用 MEGA 进行同源排序, 所得数据用于系统发育分析。

表 2 构建系统发育树使用的线粒体细胞色素 *b* 基因序列 (53 种田鼠与 1 种黑线仓鼠作为外群)

Table 2 Accession numbers of Cyt *b* (53 voles and 1 outgroup *Cricetulus griseus*) used to reconstruct phylogenetic trees

物种 Species	登录号 Access number	物种 Species	登录号 Access number
<i>M. abbreviatus</i>	GU809086.1	<i>M. montebelli</i>	AF163900.1
<i>M. agrestis</i>	AY167213.1	<i>M. multiplex</i>	AJ717747.1
<i>M. anatolicus</i>	FJ767741.1	<i>M. oaxacensis</i>	AF410260.1
<i>M. arvalis</i>	KP255620.1	<i>M. obscurus</i>	KF839586.1
<i>M. bavaricus</i>	DQ841693.1	<i>M. ochrogaster</i>	AF163901.1
<i>M. cabreriae</i>	JX284284.1	<i>M. oconomus</i>	AB372207.1
<i>M. californicus</i>	AF163891.1	<i>M. oregoni</i>	AF163903.1
<i>M. canicaudus</i>	AF163892.1	<i>M. pennsylvanicus</i>	AF119279.1
<i>M. chrotorrhinus</i>	AF163893.1	<i>M. pinetorum</i>	AF163904.1
<i>M. daghestanicus</i>	AY513792.1	<i>M. pyrenaicus</i>	AJ717748.1
<i>M. duodecimcostatus</i>	AJ717744.1	<i>M. quasiater</i>	AF410259.1
<i>M. fortis</i>	FJ986308.1	<i>M. richardsoni</i>	AF163905.1
<i>M. gerbei</i>	AY513802.1	<i>M. rossiaemeridionalis</i>	AY513823.1
<i>M. guentheri</i>	AY513806.1	<i>M. savii</i>	AY513828.1
<i>M. juldaschi</i>	AY513808.1	<i>M. socialis</i>	KC953626.1
<i>M. kikuchii</i>	AF163896.1	<i>M. subterraneus</i>	AJ717745.1
<i>M. kirgisorum</i>	AY513810.1	<i>M. tatricus</i>	AY513839.1
<i>M. liechtensteini</i>	AY513811.1	<i>M. thomasi</i>	AY513844.1
<i>M. limnophilus</i>	HQ123612.1	<i>M. townsendii</i>	AF163906.1
<i>M. longicaudus</i>	AF187230.1	<i>M. umbrosus</i>	AF410261.1
<i>M. lusitanicus</i>	AY513813.1	<i>M. xanthognathus</i>	AF163907.1
<i>M. majori</i>	AY513814.1	<i>N. fuscus</i>	JF906122.1
<i>M. maximowiczii</i>	FJ986319.1	<i>N. irene</i>	HQ123619.1
<i>M. mexicanus</i>	AF163897.1	<i>N. sikimensis</i>	HQ123604.1
<i>M. middendorffi</i>	AF163898.1	<i>L. brandtii</i>	JF906120.1
<i>M. miurus</i>	AF163899.1	<i>L. mandarinus</i>	JX014233.1
<i>M. montanus</i>	AF119280.1	<i>Cricetulus griseus</i>	NC007936.1

系统树采用最大似然法 (Maximum likelihood, ML) 和贝叶斯法 (Bayesian inference, BI) 创建, 最适模型利用 jModelTest - 2.1.6 (Darriba *et al.*, 2012) 软件检测。最大似然树用 RAxML (Stamatakis, 2014) 软件生成, 采用的模型为 GTR + I + G, 并且对分枝的置信度进行 10 000 次的 Bootstrap 自举检验。贝叶斯树用 MrBayes 3.2.5 (Ronquist *et al.*, 2012) 软件生成, 采用的模型也为 GTR + I + G, 以后验概率来表示各分支的可信性; 共执行 1 000 万代运算, 舍弃前 20% 不稳定分歧频率条件下产生的树 (burn-in samples), 而剩下的树用于计算一致性树 (consensus tree)。参考 Jaarola 等 (2004) 和 Liu 等 (2012) 所建种间系统发育关系, 对各进化枝进行属或组水平的归类命名。

根据系统发育树, 按照单倍型在各分支的聚集情况, 将其分为单倍型组。使用 DAMBE 软件 (Xia *et al.*, 2001) 基于 JC (Jukes and Cantor's distance) 模型, 计算组内和单倍型组间两两单倍型距离。同时, 计算不同组的单倍型与 GenBank 中下载的柴达木根田鼠、青海松田鼠、高原松田鼠参考序列之间的遗传距离 (登录号见表 2), 以及这三个参考序列之间的遗传距离。

## 2 结果

### 2.1 数据描述

一共获得 189 条 Cyt *b* 基因全序列, 长度均为 1 143 bp。核苷酸组成为: A = 29.33%, T = 26.01%, C = 31.25%, G = 13.40%。共检测到变异位点 261 个, 占总位点数的 22.8%, 其中单突变位点 248 个, 简约信息位点 13 个。共检测到 65 个单倍型, 已提交到 GenBank 中 (GenBank 号 KU214679 - KU214743)。各单倍型在不同采样点的分布在表 1 中列出。

### 2.2 系统树

最大似然树 (图 2) 和贝叶斯树 (图 3) 的结构基本一致, 所有田鼠序列聚为 7 大枝: *Terricola*、*Microtus*、Nearctic species、*Agricola*、*Neodon*、Asian group 和 *Lasiopodomys*。本研究中共生成 65 个单倍型可以分为三组: 第一组 (G1), 包含单倍型 H12 - 19、H21 - 45、H47 - 57、H62 - 65, 与已知的柴达木根田鼠 (*M. limnophilus*) 聚为一枝; 第二组 (G2), 包含单倍型 H1 - 5、H20、H58 - 61,

与已知的青海松田鼠 (*N. fuscus*) 聚为一枝; 第三组 (G3), 包含单倍型 H6 - 11、H46, 与已知的高原松田鼠 (*N. irene*) 聚为一枝。所有以上三组与对应的参考物种聚类时, 支持度为 ML 与 BI 树的支持率都为 100%。在大类上, 柴达木根田鼠聚在 Asian group 大枝中, 青海松田鼠和高原松田鼠聚在 *Neodon* 大枝中。

### 2.3 遗传距离

遗传距离统计显示, G1、G2、G3 组内两两单倍型之间的遗传距离范围分别为 0.09% - 3.04%、0.09% - 0.70%、0.18% - 1.95%。同时, G1 与柴达木根田鼠参考序列之间、G2 与青海松田鼠参考序列之间、G3 与高原松田鼠参考序列之间遗传距离范围分别为 0.61% - 2.49%、0.53% - 0.97%、1.77% - 2.22%。具体遗传距离信息见表 3。

## 3 讨论

本研究的系统发育分析显示, G1、G2、G3 单倍型组分别与柴达木根田鼠、青海松田鼠、高原松田鼠聚为一枝, 支持率达到 100%。需要指出的是, 最大似然法和贝叶斯法得到的系统树大类上的结构完全一致, 仅在支持率上有一些差别, 表明我们的系统发育分析方法可靠。根据现有资料, 田鼠类的种内遗传距离范围为 4% - 7.2%, 而近缘物种之间遗传距离一般不超过 8% (Jarrola *et al.*, 2004)。本研究中, G1、G2、G3 组内两两单倍型之间的遗传距离都小于 4%, G1 与柴达木根田鼠参考序列之间、G2 与青海松田鼠参考序列之间、G3 与高原松田鼠参考序列之间遗传距离范围也都小于 4%。同时, 组间单倍型遗传距离 (G1 *vs.* G2, G1 *vs.* G3, G2 *vs.* G3) 全部大于 8%, 进一步证实了 G1、G2、G3 分别属于 3 个不同的物种。结合系统发育分析和遗传距离数据, 我们在青藏高原东部采集到的田鼠样品, 可分为 3 个物种: 柴达木根田鼠 (*M. limnophilus*)、青海松田鼠 (*N. fuscus*) 和高原松田鼠 (*N. irene*)。其中, 在门源 (MY)、化隆 (HL)、河南 (HN)、大通 (DT)、刚察 (GC)、香日德 (XRD)、泽库 (ZK)、玛曲 (MQ)、久治 (JZ)、临夏 (LX) 10 个地点都有柴达木根田鼠分布; 在兴海 (XH)、同德 (TD)、达日 (DR)、河南 (HN) 4 个地点有青海松田鼠分

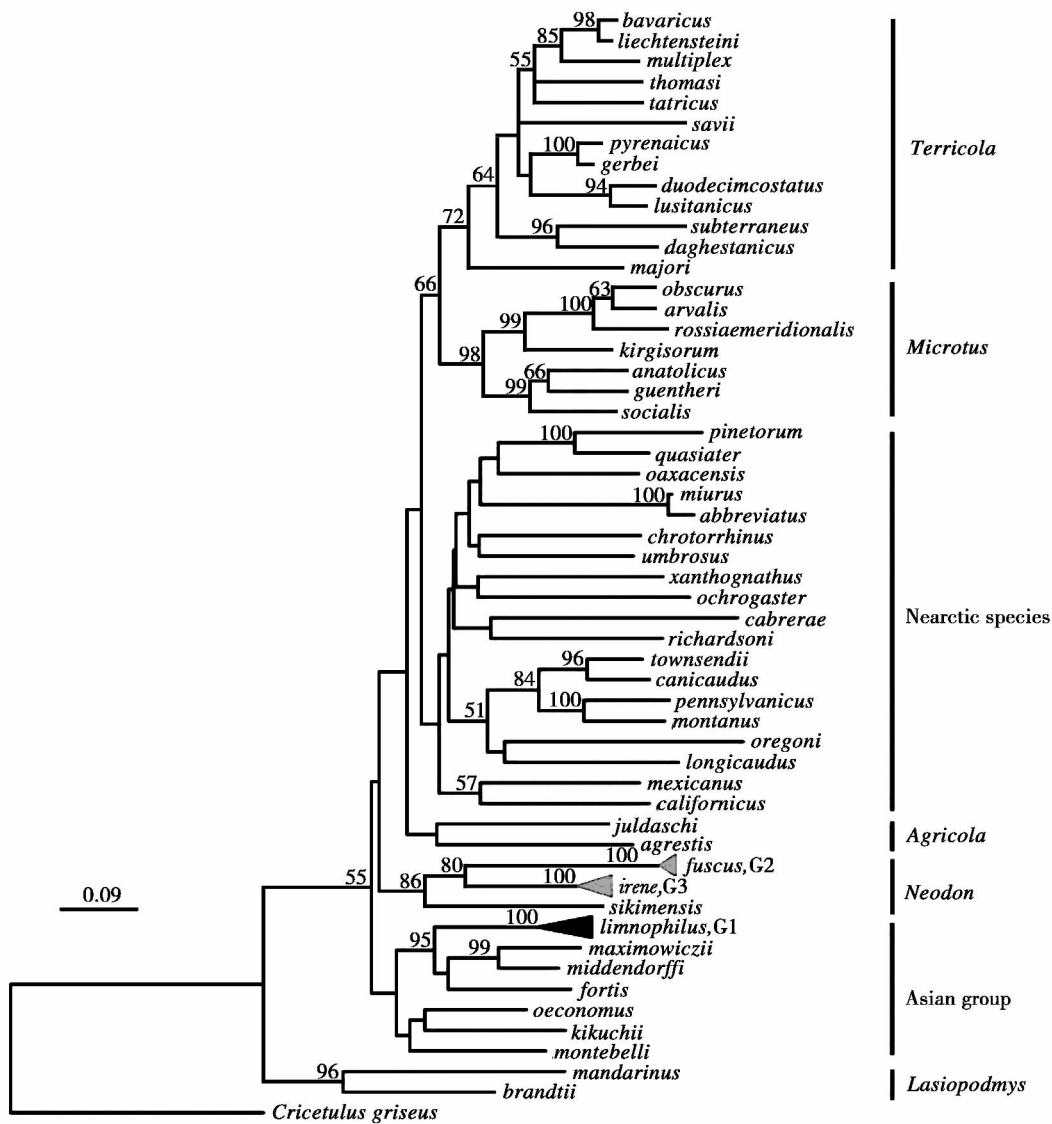


图2 最大似然系统树 (所有序列下载自 GenBank, 登录号见表2; G1、G2、G3 为单倍型组; 节点附近的数字为 bootstrap 支持率, 仅显示大于 50% 的数值)

Fig. 2 Maximum likelihood phylogenetic tree with all the reference sequences downloaded from GenBank ( See Table 2 ); the G1 , G2 and G3 show haplotype groups; bootstrap support above 50% is shown at nodes

布; 在贵南 (GN)、祁连 (QL)、贵德 (GD) 3 个地点有高原松田鼠分布。总体来看, 柴达木根田鼠在青藏高原东部地区分布最广, 在同一采样点不同物种之间重叠度较小。

长期以来, 关于柴达木根田鼠在青海省的分布, 多有争议。这些争议的产生, 与对此物种的分类观点和命名方式的不一致有很大关系。王应祥等 (2003) 将其视为根田鼠柴达木亚种 (*M. oeconomus limnophilus*), 认为其分布区仅限于青海省西北部的柴达木盆地。相反, Smith 和解焱 (2009) 将

其称为经营田鼠 (*M. limnophilus*), 认为其主要在青海省东部地区分布。而蒋志刚等 (2015) 则将其称为柴达木根田鼠 (*M. limnophilus*), 认为在青海省东部和柴达木盆地都有分布。就其分布区域而言, 本研究的采样范围多数为青海省东部地区, 但也包括柴达木盆地的香日德地区, 即本研究结果倾向于支持蒋志刚等 (2015) 的观点, 尽管未来仍然需要继续增加柴达木盆地的采样范围, 以进一步论证此观点。综合我们的研究结果, 同时考虑到其模式产地为柴达木盆地的甘森和格孜湖(中国科学

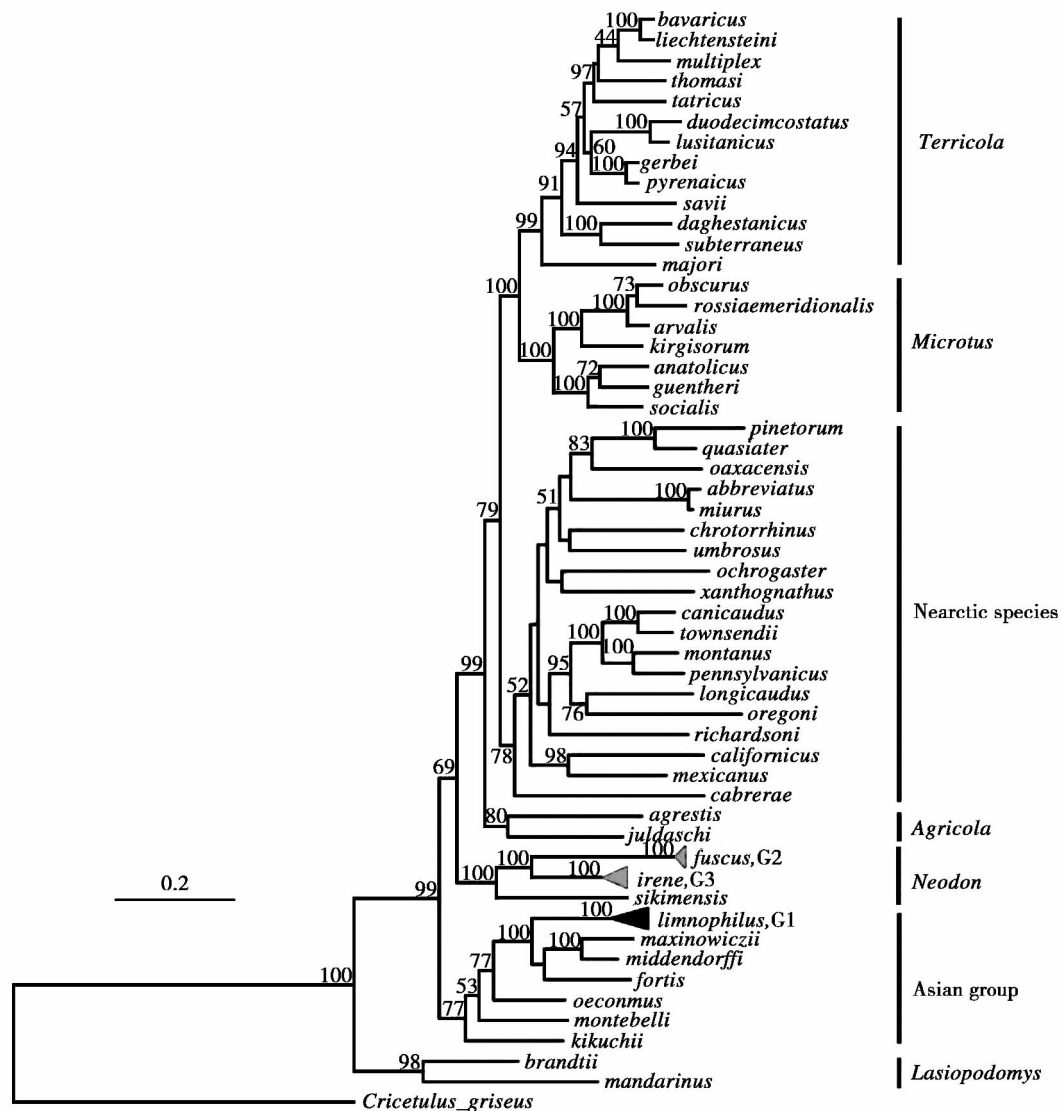


图3 贝叶斯系统树(所有序列下载自 GenBank, 登录号见表2; G1、G2、G3 为单倍型组; 后验概率标示在节点附近, 仅显示大于 50% 的数值)

Fig. 3 Bayesian inference phylogenetic tree with reference sequences downloaded from GenBank (See Table 2 for details); the G1, G2 and G3 show haplotype groups; numbers at nodes represent above 50% posterior probabilities

院西北高原生物研究所, 1989), 本文同意蒋志刚等 (2015) 的观点, 将其称为柴达木根田鼠。此外, Liu 等 (2012) 的研究显示, 柴达木根田鼠在四川省的若尔盖、德格、炉霍、阿坝等地也有分布。

青海松田鼠是青海草原及部分毗邻地区的特有种, 中国科学院西北高原生物研究所 (1989) 和罗泽珣等 (2000) 依据其形态特征将其定名为青海松田鼠 (*Microtus fuscus*)。王应祥等 (2003) 将其命名为青海毛足田鼠 (*Lasiopodomys fuscus*)。Liu

等 (2012) 结合分子与形态学证据, 将其归到松田鼠属 (*Neodon*) 中, 蒋志刚等 (2015) 将其定名为青海松田鼠 (*Neodon fuscus*)。本研究的系统发育分析结果再次支持了该观点。本研究中青海松田鼠主要分布于兴海、达日、同德三县, 河南县也采集到 1 只, 分布海拔 3 477 - 4 113 m, 与柴达木根田鼠 2 512 - 3 650 m 和高原松田鼠 3 135 - 3 304 m 的分布海拔相比, 相对较高。根据以前记录, 青海松田鼠主要分布于通天河及黄河上游部分区域 (中国科学院西北高原生物研究所, 1989),

表3 基于JC模型的单倍型组(G1、G2、G3)和参考物种序列之间遗传距离百分数(左下角为区间,右上角为均值±方差)

Table 3 JC genetic distances (percent) of among haplotype groups (G1, G2 and G3) three reference species (lower-left triangle, range; upper-right triangle, mean ± SD)

分组 Group	G1	G2	G3	柴达木根田鼠 <i>M. limnophilus</i>	青海松田鼠 <i>N. fuscus</i>	高原松田鼠 <i>N. irene</i>
G1	—	14.95 ± 0.1723	12.43 ± 0.1194	1.15 ± 0.1201	14.70 ± 0.3383	12.45 ± 0.3326
G2	13.90 - 15.71	—	12.06 ± 0.0314	15.43 ± 0.1439	0.73 ± 0.0176	11.50 ± 0.1032
G3	11.51 - 13.16	11.51 - 12.33	—	12.45 ± 0.0921	12.10 ± 0.1413	2.08 ± 0.0266
柴达木根田鼠 <i>M. limnophilus</i>	0.61 - 2.49	15.17 - 15.60	12.33 - 12.64	—	—	—
青海松田鼠 <i>N. fuscus</i>	14.00 - 15.28	0.53 - 0.97	11.82 - 12.23	14.96	—	—
高原松田鼠 <i>N. irene</i>	11.62 - 13.16	11.31 - 11.62	1.77 - 2.22	12.75	11.51	—

所用的柴达木根田鼠、青海松田鼠、高原松田鼠参考序列下载自 GenBank (登录号见表2)

The reference sequences of *M. limnophilus*, *N. fuscus* and *N. Irene* were downloaded from GenBank (See Table 2)

与本研究结果相符。除青海省外,四川省西北部(如石渠县)也是青海松田鼠的重要分布区(Liu *et al.*, 2012)。

高原松田鼠的中文命名一直比较固定,仅拉丁名的属名从早期的 *Pitymys* 变为 *Neodon*。这是由于松田鼠属(*Neodon*)曾经被认为是 *Pitymys* 下的一个亚属(郑昌琳和汪松, 1980),而最新的分类标准将其定为独立属(Musser and Carleton, 2005; Shenbrot and Krasnov, 2005)。高原松田鼠在青藏高原的东缘和横断山脉有分布,青海省除了柴达木盆地和羌塘高原都有分布(罗泽珣等, 2000)。本研究中,贵南、祁连、贵德3个地区采集到高原松田鼠,符合对高原松田鼠分布的描述。目前,在四川省的许多区域,已获得高原松田鼠的分布信息并得到 *Cyt b* 基因数据的支持(Fan *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2012)。

本研究利用分子标记技术,结合遗传距离统计和系统发育分析,对青藏高原东部田鼠类动物进行分子鉴定,为了解这一地区田鼠类动物的物种分布提供可靠基础资料,同时,也为这一地区的田鼠类动物的分子鉴定方法提供一个研究案例。本研究中,无论是系统发育分析还是遗传距离统计,对物种的判定界限都非常清晰,可见,利用分子鉴定方法在田鼠类动物分类方面具有重要价值。此外,本研究对每一个采样点都提供实测的经纬度信息,为本区域的实地工作提供准确的地理信息数据。本研究的一个不足之处是采样规模较小,未来仍然需要

继续增加采样范围和采样密度,同时,结合生态学因素分析,以进一步促进对这一地区田鼠类动物区系组成的了解。

#### 参考文献:

- Darriba D, Taboada G L, Doallo R, Posada D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat Methods*, **9** (8): 772 - 772.
- Fan Z, Liu S, Liu Y, Zhang X, Yue B. 2011. How Quaternary geologic and climatic events in the southeastern margin of the Tibetan Plateau influence the genetic structure of small mammals: inferences from phylogeography of two rodents, *Neodon irene* and *Apodemus latronum*. *Genetica*, **139**: 339 - 351.
- Hebert P D N, Cywinska A, Ball S L, deWaard J R. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc R Soc B*, **270**: 313 - 321.
- Huang W, Xia L, Yang Q S, Feng Z J. 2008. Distribution pattern and zoogeographical division of mammals on the Qinghai-Tibet Plateau. *Acta Theriol Sin*, **28** (4): 375 - 394. (in Chinese)
- Jaarola M, Martínková N, Gündüz I, Brunhoff C, Zimab J, Nadachowski A, Amori G, Bulatova N S, Chondropoulos B, Fraguadakis-Tsolis S, González-Esteban J, López-Fuster M J, Kandaurov A S, Kefelioglu H, Mathias M D L, Villate I, Searle J B. 2004. Molecular phylogeny of the speciose vole genus *Microtus* (Arvicolinae, Rodentia) inferred from mitochondrial DNA sequences. *Mol Phylogenet Evol*, **33** (3): 647 - 663.
- Jiang Z G, Ma Y, Wu Y, Wang Y X, Zhou K Y, Liu S Y, Feng Z J. 2015. China's Mammal Diversity and Geographic Distribution. Beijing: Science Press, 278 - 311. (in Chinese)
- Librado P, Rozas J. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, **25**: 1451 - 1452.



- Liu S Y , Sun Z Y , Liu Y , Fan Z X , Guo P , Murphy R W. 2012. A new vole from Xizang , China and the molecular phylogeny of the genus *Neodon* ( Cricetidae: Arvicolinae) . *Zootaxa* , **3235**: 1 – 22.
- Luo Z X , Chen W , Gao W. 2000. Fauna Sinica , Mammalia Vol. 6 , Cricetidae. Beijing: Science Press , 188 – 277. ( in Chinese)
- Musser G G , Carleton M D. 2005. Superfamily Muroidea. In: Wilson D E , Reeder D M eds. Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference , 3rd ed. Baltimore: The Johns Hopkins University Press , 955 – 1188.
- Ronquist F , Teslenko M , Mark P V D , Ayres D L , Darling A , Höhna S , Larget B , Liu L , Suchard M A , Huelsenbeck J P. 2012. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst Biol* , **61** ( 3) : 539 – 542.
- Shenbrot G I , Krasnov B R. 2005. Atlas of the Geographic Distribution of the Arvicoline Rodents of the World ( Rodentia , Muridae: Arvicolinae) . Bulgaria: Pensoft , 7 – 34.
- Smith A , Xie Y. 2009. A Guide to the Mammals of China. Changsha: Hunan Education Publishing House , 96 – 132. ( in Chinese)
- Stamatakis A. 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* , **30** ( 9) : 1312 – 1313.
- Tamura K , Peterson D , Peterson N , Stecher G , Nei M , Kumar S. 2011. MEGA 5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood , evolutionary distance , and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* , **28**: 2731 – 2739.
- Wang X T. 1991. Vertebrate Fauna of Gansu. Lanzhou: Gansu Science and Technology Publishing House , 1060 – 1061. ( in Chinese)
- Wang Y X. 2003. Taxonomy and Distribution of Mammalian Species and Subspecies in China. Beijing: China Forestry Publishing House , 161 – 190. ( in Chinese)
- Xia X , Xie Z. 2001. DAMBE: software package for data analysis in molecular biology and evolution. *J Hered* , **92** ( 4) : 371 – 373.
- Zhang J J , Yang Y S , Li Q. 2008. Investigation on kinds and geographic distribution of rodents in Qinghai Province. *Chinese Journal of Hygienic Insecticides and Equipments* , **14** ( 1) : 47 – 49. ( in Chinese)
- Zheng C L , Wang S. 1980. On the taxonomic status of *Pitymys Leucurus* Blyth. *Acta Zootaxonomica Sinica* , **5** ( 1) : 106 – 112. ( in Chinese)
- Smith A T , 解焱. 2009. 中国兽类野外手册. 长沙: 湖南教育出版社 , 96 – 132.
- 黄薇 , 夏霖 , 杨奇森 , 冯祚建. 2008. 青藏高原兽类分布格局及动物地理区划. *兽类学报* , **28** ( 4) : 375 – 394.
- 蒋志刚 , 马勇 , 吴毅 , 王应祥 , 周开亚 , 刘少英 , 冯祚建. 2015. 中国哺乳动物多样性及地理分布. 北京: 科学出版社 , 278 – 311.
- 中国科学院西北高原生物研究所. 1989. 青海经济动物志. 西宁: 青海人民出版社 , 690 – 691.
- 罗泽珣 , 陈卫 , 高武. 2000. 中国动物志 , 兽纲第六卷 , 仓鼠科. 北京: 科学出版社 , 188 – 277.
- 王香亭. 1991. 甘肃动物志. 兰州: 甘肃科学技术出版社 , 1060 – 1061.
- 王应祥. 2003. 中国哺乳动物种和亚种分类名录与分布大全. 北京: 中国林业出版社 , 161 – 190.
- 张继军 , 杨银书 , 李强. 2008. 青海省啮齿动物种类与地理分布. *中华卫生杀虫药械* , **14** ( 1) : 47 – 49.
- 郑昌琳 , 汪松. 1980. 白尾松田鼠分类志要. *动物分类学报* , **5** ( 1) : 106 – 112.