

基于 *Cytb* 基因的穿山甲科物种鉴定研究王辰¹, 杨娅富¹, 李立², 逯金瑶², 李嘉昊¹, 李波^{1,3*}

(1. 东北林业大学野生动物与自然保护地学院, 黑龙江哈尔滨

150040; 2. 湖南省生物多样性保护中心, 湖南长沙 410000; 3. 国家林业和草原局野生动植物检测中心, 黑龙江哈尔滨 150040)

摘要 为鉴别混有非穿山甲物种疑似检材的来源物种, 基于细胞色素 b 基因设计了穿山甲科特异的新引物 DCW-F1/DCW-R1。试验表明: 其特异性良好、灵敏度较高、适用检材类型较广。采用 BLAST 比对法、遗传距离法和系统发育法分析了 4 组不同长度 *Cytb* 序列, 研究序列长度对穿山甲物种鉴定的影响。结果表明, 多数样本与相应穿山甲物种同源序列相似度均高于 98%, 建议将该值作为 BLAST 比对的判别标准; 除马来穿山甲(211 bp)和树穿山甲(421 和 211 bp)外, 剩余 5 个穿山甲物种间最小遗传距离均大于种内最大遗传距离, 序列长度的变化和样本量的不平衡会导致该比值不稳定; 除马来穿山甲和菲律宾穿山甲, 其余物种均为单系, 序列长度变短使得系统发育树拓扑结构和分支置信度发生相应变化。

关键词 物种鉴定; 穿山甲; 细胞色素 b 基因(*Cytb*); 序列分析

中图分类号 S863 **文献标识码** A

文章编号 0517-6611(2023)03-0089-07

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2023.03.020



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Species Identification for Pangolins Based on Cytochrome b Gene

WANG Chen¹, YANG Ya-fu¹, LI Li² et al (1. College of Wildlife and Natural Reserve, Northeast Forestry University, Harbin, Heilongjiang 150040; 2. Hunan Biodiversity Conservation Center, Changsha, Hunan 410000)

Abstract A pair of new specific primers DCW-F1/DCW-R1 were designed based on Cytochrome b (*Cytb*) gene to identify suspected specimens mixed with non-pangolin species. The results showed that it was good specificity, high sensitivity and could be used for several type samples. Secondly, we used BLAST comparison, genetic distance and constructing phylogenetic tree to analyze the four groups of *Cytb* sequences with different lengths, in order to estimate the influence of changing sequence length on pangolin identification. The results indicated that the similarity of homologous sequence between most samples and corresponding pangolin was higher than 98%. This suggested that the value should be used as the criterion to identify pangolin species. The minimum inter-specific genetic distance (inter-d) was greater than the maximum Intra-specific genetic distance (intra-d) among five pangolins with the exception of *M. javanica* (211bp) and *P. tricuspis* (421 and 211 bp). The variation of sequence length and the imbalance of sample size could cause unstable ratio. Phylogenetic trees showed that most pangolin species except *M. javanica* and *M. culionensis* were monophyletic, and their topological structure and confidence for some nodes changed with the sequence being shorter.

Key words Species identification; Pangolin; Cytochrome b; Sequence analysis

穿山甲是哺乳纲(Mammalia)鳞甲目(Pholidota)穿山甲科(Manidae)动物的统称。现存 3 属 8 种: 穿山甲属(*Manis*)的中华穿山甲(*M. pentadactyla*)、印度穿山甲(*M. crassicaudata*)、马来穿山甲(*M. javanica*)和菲律宾穿山甲(*M. culionensis*); 地穿山甲属(*Smusia*)的南非穿山甲(*S. temminckii*)和大穿山甲(*S. gigantea*); 长尾穿山甲属(*Phataginus*)的树穿山甲(*P. tricuspis*)和长尾穿山甲(*P. tetradactyla*), 分布于亚洲和非洲的热带和亚热带地区^[1-6]。

穿山甲因有食用和药用价值而遭到人类的乱捕滥猎, 加之生境被破坏及外来物种入侵等因素, 其野生种群数量急剧下降, 甚至面临灭绝^[7-8]。2016 年 10 月, CIETS 缔约国大会通过“所有 8 种穿山甲物种由附录 II 提升至附录 I”的提案^[9-10]。由此, 为打击穿山甲的非法贸易需要选择合适的分子标记、构建标准的物种鉴定方法。

线粒体基因组作为“扩展条形码”^[11], 常用于物种鉴定

和系统发育关系评估^[12-13]。该技术成本较为昂贵, 不适合在穿山甲非法贸易频发的东南亚和非洲国家推广使用。线粒体细胞色素 b (Cytochrome b, *Cytb*) 基因进化速率适中、含有丰富的遗传信息、结构清晰, 被广泛地应用于物种鉴定^[14]。目前, 基于 *Cytb* 基因的穿山甲物种鉴定多是利用脊椎动物或哺乳动物通用引物, 所扩增的序列长度长短不一^[15-18]。研究表明, 利用穿山甲科特异引物可以有效排除非目标物种的干扰^[15], *Cytb* 基因序列长度变化可能影响鉴定结果的判读^[19]。由此, 笔者依据 *Cytb* 基因设计了穿山甲科物种鉴定的特异引物, 并评估 4 种长度的 *Cytb* 基因序列对穿山甲物种鉴定的影响。

1 材料与方法

1.1 材料 收集 191 份穿山甲样品。其中, 174 份为已知马来穿山甲样本, 包括 128 份肌肉样, 18 份皮肤样, 12 份粪便样, 7 份毛发样, 9 份鳞片样, 剩余 17 份样本为未知穿山甲样本, 其中包括 1 份疑似穿山甲鳞片粉末(表 1)。利用智人(*Homo sapiens*, *n*=3)、貉(*Nyctereutes procyonoides*, *n*=3)、朱顶雀(*Acanthis flammea*, *n*=3)、东北兔(*Lepus mandshuricus*, *n*=1)、牛(*Bos taurus*, *n*=1)、虎(*Panthera tigris*, *n*=1)、家猪(*Sus scrofa domestica*, *n*=1)的 DNA 作为非穿山甲物种对照样本。上述样本均来自国家林业和草原局野生动植物检测中心样本库。样品采集后于 -20 °C 冰箱内保存。同时, 从 NCBI 上下载 135 条序列穿山甲物种(表 1)和部分非穿

基金项目 珍稀濒危物种调查监管与行业规范项目(2020070209-4); 湖南省林业科技创新计划项目(XLK201915)。

作者简介 王辰(1997—), 男, 天津人, 硕士研究生, 研究方向: 分子生物学。* 通信作者, 副教授, 从事动物遗传育种与繁殖研究。

鸣谢 试验样本的采集得到了国家林业和草原局野生动植物检测中心徐艳春教授、金煜教授、白素英副教授等的大力支持与帮助, 在此一并致谢。

收稿日期 2022-03-22

山甲物种的 *Cytb* 基因同源序列用于引物设计和序列综合分析。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取。穿山甲鳞片用 75% 乙醇清洗表面,经灭菌去离子水清洗、风干后剪取其表面残留的皮肤组织或毛发,或钻取鳞片粉末。将皮肤、毛发及鳞片粉末分别装入

1.5 mL 离心管。将肌肉样剪碎后置于 1.5 mL 离心管。使用 AxyPrep™ Multisource Genomic DNA Miniprep Kit 试剂盒(爱思进)提取肌肉、毛发、皮肤及鳞片的总 DNA。另外,称取 180~220 mg 的粪便使用 QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit 试剂盒(爱思进)提取总 DNA。DNA 提取步骤均参考试剂盒说明书,DNA 原液存放于 -20 °C 冰箱。

表 1 穿山甲科试验样本及 GenBank 来源序列信息

Table 1 Experimental samples and sequence information downloaded from GenBank for pangolin

种 Species	来源 Source	GenBank 登录号和样本编号 GenBank ID and sample number			
		MJ-L(1 140 bp)	MJ-M (762 bp)	MJ-S (421 bp)	MJ-DCW (211 bp)
印度穿山甲 (<i>M. crassicaudata</i>)	[11]	NC036433、 MG196304~MG196306	NC036433、 MG196304~MG196306	NC036433、 MG196304~MG196306	NC036433、 MG196304~MG196306
中华穿山甲 (<i>M. pentadactyla</i>)	[20]	MT335859	MT335859	MT335859	MT335859
	*	KT445978	MN365834、KT445978	MN365834、KT445978	KT445978
	[21]	JN411577、NC016008	JN411577、NC016008	JN411577、NC016008	JN411577、NC016008
	[11]	MG196307	MG196307	MG196307	MG196307
马来穿山甲 (<i>M. javanica</i>)	*	PA-L-1	PA-M-1	PA-S-1	MP-DCW-1
	*	MT875194、MN365836、 KT445979	MT875194、MN365833、 MN365835、MN365836、 KT445979	MT875194、MN365833、 MN365835、MN365836、 KT445979	MT875194、MN365836、 KT445979
	[13]	KP306515、NC026781	KP306515、NC026781	KP306515、NC026781	KP306515、NC026781
	[11]	MG196302、MG196309	MG196302、MG196309	MG196302、MG196309	MG196302、MG196309
	[22]	MG825495~MG825551	MG825495~MG825551	MG825495~MG825551	MG825495~MG825551
		MJ-L-1~14、16~18、 20~29、31~35、37~48、 51~73、75~82、84、90、 92~101、103~104、 110~112、114~115、 117、121、127、142、146、 PA-L-5、7	MJ-M-1~39、41~68、 70~88、90~101、103~ 111、113~115、117、121、 127、142、146、148~159、 161~178、182~184、191 ~195、PA-M-5、7	MJ-S-1~39、41~68、70 ~88、90~101、103~ 111、113~115、117、121、 127、142、146、148~159、 161~178、182~184、191 ~195、PA-S-5、7	MJ-DCW-1~29、MJ- DCW-38、MJ-DCW- 42~43、MJ-DCW-48、 MJ-DCW-50~53、MJ- DCW-66、MJ-DCW- 70、MJ-DCW-73、MJ- DCW-78、MJ-DCW- 85~86、MJ-DCW-111、 FGI-SE-02-01、FGI- SE-01-02、FGI-SE- 10-1、SJ-2020-292
菲律宾穿山甲 (<i>M. culionensis</i>)	[11]	NC036434、MG196308	NC036434、MG196308	NC036434、MG196308	NC036434、MG196308
大穿山甲 (<i>S. gigantea</i>)	[23]	NC036064、MF536684	NC036064、MF536684	NC036064、MF536684	NC036064、MF536684
	[11]	MG196301、MG196303	MG196301、MG196303	MG196301、MG196303	MG196301、MG196303
		PA-L-3	PA-M-3	PA-S-3	SG-DCW-1~2
南非穿山甲 (<i>S. temminckii</i>)	[24]	KP125951	KP125951	KP125951	KP125951
	[13]	KP306516	KP306516	KP306516	KP306516
	[24]	NC025769	NC025769	NC025769	NC025769
	[23]	MF536685~MF536687	MF536685~MF536687	MF536685~MF536687	MF536685~MF536687
	[11]	MG196300	MG196300	MG196300	MG196300
长尾穿山甲 (<i>P. tetradactyla</i>)	[25]	NC004027	NC004027	NC004027	NC004027
	[21]	MF509825	MF509825	MF509825	MF509825
	[11]	MG196299	MG196299	MG196299	MG196299
树穿山甲 (<i>P. tricuspis</i>)	[13]	KP306514、NC026780	KP306514、NC026780	KP306514、NC026780	KP306514、NC026780
	[21]	MF536683	MF536683	MF536683	MF536683
	[11]	MG196296~MG196298、 MG196310	MG196296~MG196298、 MG196310	MG196296~MG196298、 MG196310	MG196296~MG196298、 MG196310
	PA-L-6、10、11	PA-M-6、10、11	PA-S-6、10、11	MT-DCW-1~7、SJ- 2018-72-2、SJ-2018- 72-3	

注: * 代表直接提交到 GenBank。

Note: * are directly submitted to GenBank.

1.2.2 引物设计。利用 Primer PREMIER 6.0 软件基于马来穿山甲 *Cytb* 全序列设计穿山甲科特异 PCR 引物。引物搜寻参数包括:熔解温度 (T_m) 为 60 °C、引物长度 (Length) 为 18~

30 bp、扩增产物长度 (amplication length) 为 70~200 bp,余下参数为默认值。使用 MEGA 5.0 中的 BLAST 程序筛选满足设计原则的引物,参考的非穿山甲物种的同源序列包括:兔

形目的穴兔 (*Oryctolagus cuniculus*, HQ596486、KT626640)、食肉目的土狼 (*Canis latrans*, KT447695 ~ KT447698) 和家犬 (*Canis lupus familiaris* GU249573、MH714782 ~ MH714784、KJ660981、KJ660982)、翼手目的蝙蝠 (*Ardops nichollsi*, KJ024748 ~ KJ024751)、偶蹄目的牛 (*Bos taurus*, KT626620)、贫齿目的犭狨 (*Dasybus novemcinctus*, KU253494, KT626619、KT626620) 和灵长目的智人 (*Homo sapiens*, JN034134 ~ JN034136)。

1.2.3 PCR 扩增和测序。利用 3 对引物:L14724/H15149^[26]、mcb398/mcb869^[27]、DCW-F1/DCW-R1 分别扩增穿山甲科自有样本(表 1) *Cytb* 基因部分序列。反应体系均为 50 μL : 5 μL DNA 模板, 0.5 μL 上、下引物, 25 μL DNA 聚合酶 (Transgen, 北京), 19 μL 灭菌去离子水。PCR 在 PE9700 型 DNA 扩增仪 (PE, 美国) 进行。L14724/H15149 反应条件为: 预变性 95 $^{\circ}\text{C}$ /5 min (变性 95 $^{\circ}\text{C}$ /30 s, 退火 56 $^{\circ}\text{C}$ /30 s, 延伸 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min), 循环 40 次, 延伸 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; mcb398/mcb869 反应条件为: 预变性 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min (变性 94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 退火 52 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 延伸 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s), 循环 35 次, 延伸 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min; DCW-F1/DCW-R1 反应条件为: 预变性 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, (变性 94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 退火 53 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 延伸 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s), 循环 35 次, 延伸 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测后送至北京擎科生物技术有限公司哈尔滨分公司利用 ABI3730XL DNA 测序仪进行双向测序。同时将 DNA 浓度 $\geq 25 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 的样本送至深圳华大基因科技有限公司, 通过鸟枪法构建文库, 使用 Illumina HiSeq2500 测序仪进行高通量测序。

1.2.4 引物有效性测试。引物特异性测试使用 NCBI/Primer-BLAST 程序验证引物 DCW-F1/DCW-R1 与 GenBank 数据库中非目标物种的结合情况。然后使用 7 个非穿山甲物种的 DNA 样品进行实证试验。最后开展混合样品试验, 将上述 7 个物种的 DNA 样本按浓度均匀混合, 再分别与 3 种不同类型(肌肉、粪便和鳞片)的穿山甲物种 DNA 抽提液混合, 浓度比为 1:1, 分别进行 PCR 扩增及测序。

引物灵敏度测试在肌肉、毛发、组织、鳞片粉及粪便样品中各取 2 个样品, 将 DNA 抽提液用灭菌去离子水从 10 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 依次稀释至 1.0、0.1 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 和 10、1 $\text{pg}/\mu\text{L}$, 使用“1.2.3”中的方法进行 PCR 扩增及电泳检测。上述引物的有效性测试中单次的 PCR 中均包含阳性对照(已知马来穿山甲 DNA)和阴性对照(灭菌去离子水)。

1.3 数据分析 利用 MegAlign 将获得的二代测序结果转成 Fasta 格式, 参考 NCBI 上的同源序列使用 MEGA5.2^[28] 手工校对; 利用 SeqMan 软件拼接一代测序获得的 *Cytb* 基因序列, 并结合测序峰图手工校对。利用 DNASP V. 6.0.70 计算该研究所得序列的单倍型。使用 MEGA5.2 软件中的 clustalW 对序列排序并校正, 计算基于 Kimura-2-Parameter 双参数 (K2P) 模型^[29] 的各穿山甲的种内和种间遗传距离, 用 boot-strap test 作 1 000 次置信度分析。使用 GenBank 数据库中的 BLAST 工具, 对所有序列进行比对, 并进行同源性分析

比对, 以确定种属。通过 PhyloSuite V. 1.2.2^[30] 基于最大似然法 (ML) 和贝叶斯法 (BI) 重建系统发育树。利用 ModelFinder (选取 BIC 标准, 模型分别选择 IQ-TREE 和 MrBayes) 得到最佳分区方案和核苷酸替换模型。应用 IQ-TREE 和 MrBayes 分别重建 ML 和 BI 系统发育树(兔形目的穴兔同源序列为外群)。

2 结果与分析

2.1 引物有效性 设计得到的引物 DCW-F1: 5'- CCTAT-TCGCATACGCAATC-3'; DCW-R1: 5'- AAGGATAGAGGC-TACTTGTC-3'。该引物经 NCBI/Primer-BLAST 程序检索, 与中华穿山甲同源序列的结合率为 90.91% ~ 100%, 其余 7 种穿山甲同源序列的结合率 $\geq 95\%$ 。实证试验表明, 该引物未扩增出任何非目标物种条带。所有混合样品的扩增子测序图谱均为单一的可识别峰图, 所得序列与混合前试验所得序列一致。1 份疑似穿山甲鳞片粉末经引物 mcb398/mcb869 扩增, 测序图谱为难以识别的混合峰图; 而经引物 DCW-F1/DCW-R1 扩增, 得到单一、可识别测序峰图。这些结果都说明该引物具有较高的特异性。灵敏度测试电泳结果: 肌肉样 DNA 稀释至 10 $\text{pg}/\mu\text{L}$ 时有可见的电泳条带; 毛发和鳞片样 DNA 可稀释至 0.1 $\text{ng}/\mu\text{L}$, 皮肤和粪便样 DNA 可稀释至 1 $\text{ng}/\mu\text{L}$ (图 1)。这表明该 PCR 系统的灵敏度足以检测这 5 种不同类型的样品。

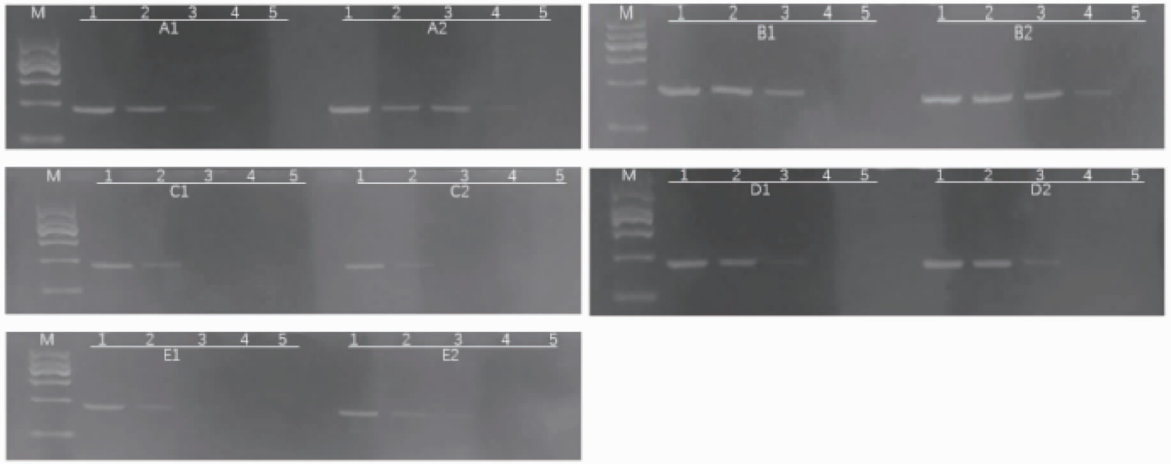
2.2 序列分析 该研究自测 4 组 *Cytb* 基因序列的单倍型数量随着序列长度变短而减少。具体是: 106 条 MJ-L (1 140 bp) 中存在 70 个单倍型, 160 条 MJ-M (762 bp) 中存在 69 个单倍型, 160 条 MJ-S (421 bp) 中存在 28 个单倍型, 60 条 MJ-DCW (211 bp) 中存在 19 个单倍型。

4 组序列中所有已知穿山甲样本序列与马来穿山甲同源序列的相似度均大于 99%。除 MJ-M 中样品 PA-M-1、MJ-DCW 中样品 MP-DCW-1 与中华穿山甲同源序列的相似度略小于 95% (94.88%、93.27%); MJ-DCW 中部分样本与树穿山甲同源序列的相似度略大于 95% (95.73%), 其余样品与对应的穿山甲同源序列的相似度均大于 98% (表 2)。其中, 前 3 组序列 (1 140、762、421 bp) 与已知 4 种穿山甲同源序列的相似度值变化很小, 但最短的 MJ-DCW 中除马来穿山甲外, 其余 3 种穿山甲同源序列的相似度有变小的趋势。

MJ-L、MJ-M、MJ-DCW 中种内遗传距离最大值和最小值分别来自树穿山甲 (0.113 6、0.117 4、0.149 4) 和马来穿山甲 (0.0、0.004 8); MJ-S 中种内遗传距离最大值和最小值分别来自树穿山甲 (0.123 9) 和中华穿山甲、马来穿山甲 (0) (表 3)。南非穿山甲和大穿山甲的前 3 组序列中, 种间遗传距离最小值是种内遗传距离最大值的 10 倍以上; 印度穿山甲和长尾穿山甲的前 3 组序列中, 该值为 5~10 倍; 马来穿山甲的 MJ-DCW 和树穿山甲的 MJ-S、MJ-DCW 中种间遗传距离最小值小于种内遗传距离最大值; 其余种穿山甲的种间遗传距离最小值是种内遗传距离最大值的 1~5 倍 (图 2)。其中马来穿山甲、大穿山甲和树穿山甲的前 3 组序列中种内遗

传距离无明显变化,MJ-DCW 中明显变大,其余种穿山甲的 4 组序列变化很小;印度穿山甲/大穿山甲/印度穿山甲/长尾穿山甲、中华穿山甲/马来穿山甲、中华穿山甲/长尾穿山甲、马来穿山甲/长尾穿山甲、马来穿山甲/大穿山甲前 3 组序列

的种间遗传距离变化很小,MJ-DCW 中明显变小;南非穿山甲和长尾穿山甲中,MJ-S 显著大于 MJ-L、MJ-M;其余种穿山甲 4 组序列的种间遗传距离变化很小。



注:A1、A2 为毛发样;B1、B2 为肌肉样;C1、C2 为皮肤样;D1、D2 为鳞片样;E1、E2 为粪便样。DNA 稀释浓度为 10 ng/μL 至 1 pg/μL;M. DL1200 Marker(1 200、900、700、500、300、100 bp)。

Note:A1 and A2 are hair samples, B1 and B2 are muscle samples, C1 and C2 are skin samples, D1 and D2 are scale samples, and E1 and E2 are faecal samples. The diluted concentration of DNA is from 10 ng/μL to 1 pg/μL. M is the DL 1 200 marker (1 200,900,700,500,300,100 bp).

图 1 灵敏度测试的琼脂糖凝胶电泳

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of sensitivity test

表 2 BLAST 比对结果

Table 2 BLAST results

序列长度 Sequence length	样本编号 Sample number	相似度 Similarity//%	比对结果 Blast results
MJ-L(1 140 bp)	MJ-L-1~146、PA-L-5、7	99.03~100	马来穿山甲(<i>M. javanica</i>)
	PA-L-1	95.26	中华穿山甲(<i>M. pentadactyla</i>)
	PA-L-3	99.91	大穿山甲(<i>S. gigantea</i>)
	PA-L-6、10、11	99.30~99.91	树穿山甲(<i>P. tricuspis</i>)
MJ-M(762 bp)	MJ-M-1~195、PA-M-5、7	99.34~100	马来穿山甲(<i>M. javanica</i>)
	PA-M-1	94.88	中华穿山甲(<i>M. pentadactyla</i>)
	PA-M-3	99.87	大穿山甲(<i>S. gigantea</i>)
	PA-M-6、10、11	99.34~99.61	树穿山甲(<i>P. tricuspis</i>)
MJ-S(421 bp)	MJ-S-1~195、PA-S-5、7	99.29~100	马来穿山甲(<i>M. javanica</i>)
	PA-S-1	95.25	中华穿山甲(<i>M. pentadactyla</i>)
	PA-S-3	100	大穿山甲(<i>S. gigantea</i>)
	PA-S-6、10、11	99.53~99.76	树穿山甲(<i>P. tricuspis</i>)
MJ-DCW(211 bp)	MJ-DCW-1~111、FGI-SE-02-01、FGI-SE-01-02、FGI-SE-10-1、SJ-2020-292	99.05~100	马来穿山甲(<i>M. javanica</i>)
	MP-DCW-1	93.27	中华穿山甲(<i>M. pentadactyla</i>)
	SG-DCW-1-2	98.07~98.10	大穿山甲(<i>S. gigantea</i>)
	MT-DCW-1~7、SJ-2018-72-2、SJ-2018-72-3	95.73~99.53	树穿山甲(<i>P. tricuspis</i>)

注:MJ-L-1~146、MJ-M-1~195、MJ-S-1~195、MJ-DCW-1~111 为所测全部马来穿山甲样本。

Note:MJ-L-1~146、MJ-M-1~195、MJ-S-1~195、MJ-DCW-1~111 are all *M. javanica* tested in this study.

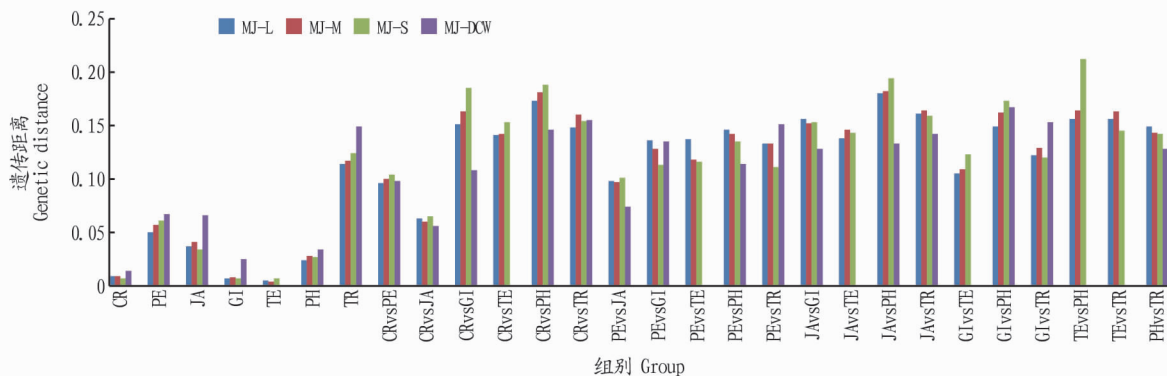
4 组序列的 ML 和 BI 系统发育树均显示出了支持良好的拓扑结构(图 3)。穿山甲物种的分化节点具有较高的置信度(60%~100%)(图 3~4)。MJ-L、MJ-M、MJ-S 中 8 种穿山甲可被分为 2 个大支:中华穿山甲、菲律宾穿山甲、马来穿山甲和印度穿山甲为一支,南非穿山甲、大穿山甲、长尾穿山甲及树穿山甲为一支。而 MJ-DCW 中 8 种穿山甲的拓扑结构发生改变,南非穿山甲和大穿山甲脱离非洲穿山甲分支并入亚洲穿山甲分支(图 4)。这表明随着序列长度变短,8 种

穿山甲的分支会逐渐合并。菲律宾穿山甲和 MJ 个体与已知马来穿山甲聚为一支,PA-1 和 MP-DCW-1 与已知中华穿山甲聚为一支,PA-3 和 SG-DCW-1、2 与已知大穿山甲聚为一支,PA-6、10、11 和 MT-DCW-1-7、SJ-2018-72-2、SJ-2018-72-3 与已知树穿山甲聚为一支。另外,有 3 条序列被证明分类错误:原标注为中华穿山甲的 JN411577 应为马来穿山甲,原标注为中华穿山甲的 NC_016008 应为马来穿山甲,原标注为长尾穿山甲的 NC_004027 应为树穿山甲。

表 3 4 组序列的种间遗传距离和种内遗传距离

Table 3 The intra-d and inter-d based on 4 groups of sequences

项目 Index	种间遗传距离 Inter-specific genetic distance				种内遗传距离 Intra-specific genetic distance			
	MJ-L	MJ-M	MJ-S	MJ-DCW	MJ-L	MJ-M	MJ-S	MJ-DCW
平均值 Mean±SD	0.145 3± 0.027 6	0.148 5± 0.029 2	0.155 2± 0.034 2	0.148 8± 0.033 5	0.019 4± 0.020 0	0.020 8± 0.020 7	0.019 1± 0.019 8	0.031 7± 0.019 0
最大值 Maximum	0.200 2	0.205 2	0.224 8	0.233 8	0.113 6	0.117 4	0.123 9	0.149 4
最小值 Minimum	0.062 9	0.059 9	0.064 8	0.056 3	0	0	0	0.004 8



注:CR. 印度穿山甲, PE. 中华穿山甲, JA. 马来穿山甲, GI. 大穿山甲, TE. 南非穿山甲, PH. 长尾穿山甲, TR. 树穿山甲。

Note: CR. *M. crassicaudata*, PE. *M. pentadactyla*, JA. *M. javanica*, GI. *S. gigantea*, TE. *S. tem minckii*, PH. *P. tetradactyla*, TR. *P. tricuspis*.

图 2 4 组序列种内遗传距离和种间遗传距离差异分布

Fig. 2 Distributions of the intra-d and inter-d on 4 groups sequences

3 讨论

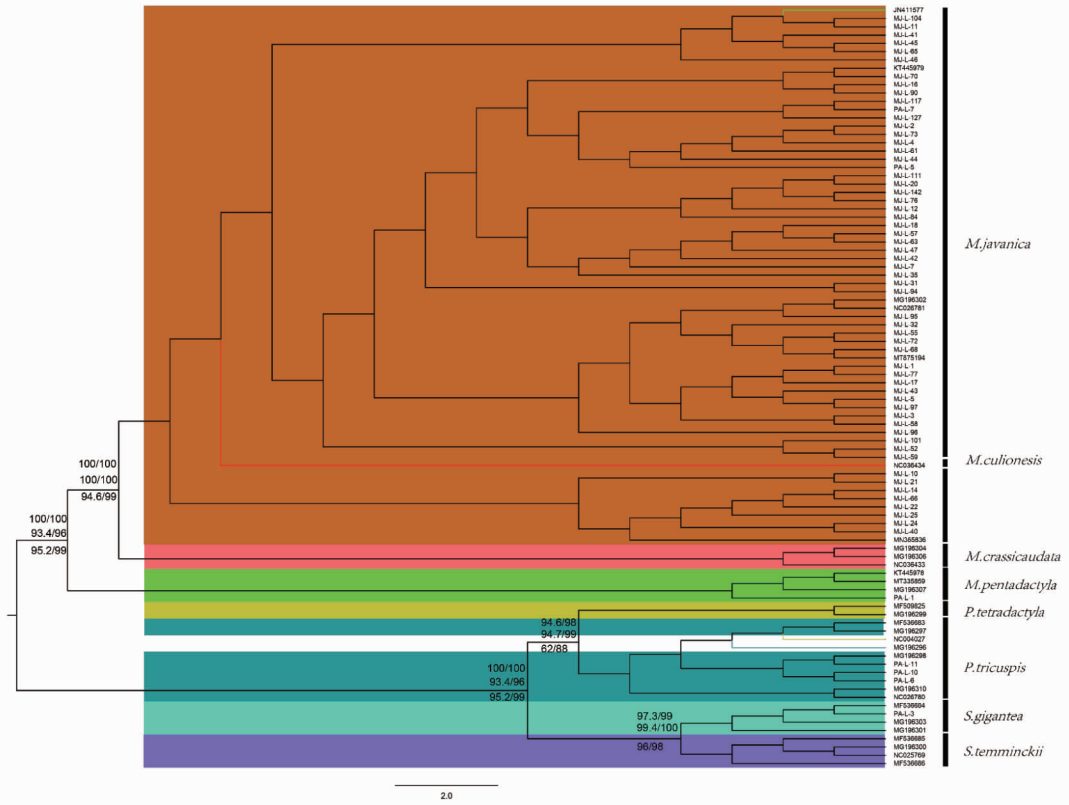
3.1 引物有效性 穿山甲物种鉴定中利用脊椎动物或哺乳动物通用引物包括 F-R-primer^[15]、GVL14724/H15149^[17-18]、L14724/H15149^[20]、mcb398/mcb869^[21]、L15601/H15748^[31], 它们具有可识别物种范围广、适用性好的特点。但上述通用引物难以鉴别混有其他非穿山甲物种的疑似检材, 部分引物因扩增片段较长, 对检材的质量要求偏高。该研究所设计的穿山甲科特异引物 DCW-F1/DCW-R1, 通过实证试验、混合试验和盲测试验均得到与目标片段一致的 DNA 序列, 未产生非目标物种条带。这表明该引物能有效、特异性识别穿山甲科物种。同时, 穿山甲的非法贸易经常涉及肌肉、皮肤、鳞片样本, 野外调查时可以收集非损伤性样本(如粪便和毛发)。上述涉案和野外调查收集样本可能会存在不同程度降解, 导致抽提的 DNA 质量不佳^[32]。新设计引物的扩增产物长度仅为 211 bp, 灵敏度试验结果也证明其良好的适用性, 可以满足不同来源的 5 种类型样本。

3.2 序列分析与判别标准 *Cytb* 基因是研究种间和种内遗传分化程度的良好指标, 常用于物种鉴定^[33]。*Cytb* 基因序列长度变化可能影响鉴定结果的判读^[19], 因此通常使用 2 种以上的序列分析方法(如 BLAST 比对法、遗传距离法、系统发育树法)开展物种鉴定^[34]。通常, BLAST 比对法中当待测样本与已知单一物种同源序列相似度高于 95% 时可以判定为同一物种^[35]。该研究只有 2 份样本与已知中华穿山甲同源序列的相似度低于该鉴定标准, 这可能与已知中华穿山甲 *Cytb* 基因序列单倍型数量偏低有关。其实脊椎动物物种鉴定中上述判别标准并不是唯一的^[36]。鉴于多数样本与相应穿山甲物种同源序列相似度均高于 98%, 建议使用相似度

98% 作为穿山甲物种判别标准。

穿山甲科物种中除马来穿山甲的 MJ-DCW 和树穿山甲的 MJ-S、MJ-DCW 外, 剩余的种间最小遗传距离均大于种内最大遗传距离, 符合遗传距离法物种鉴定判别标准^[37]。其中, 不同种穿山甲、同种穿山甲的不同组序列间的样本量差异较大, 且随着序列长度变短, 序列相似性变大, 单倍型数量逐渐减少, 物种间样本量的不平衡会导致遗传距离法结果不稳定^[38], 使得穿山甲种内遗传距离和种间遗传距离数值差异较大。此外, 树穿山甲的种内遗传距离均远大于其他种穿山甲, 高于 0.05, 且在 MJ-S、MJ-DCW 中种间最小遗传距离大于种内最大遗传距离, 这表明在树穿山甲中极有可能存在亚种^[39-41]或隐蔽物种^[18]。

系统发育树(BI 树和 ML 树)法鉴别物种的判别标准: 同一物种的不同个体聚为单系分支^[42]。该研究中 4 组序列构建的系统发育树, 待测样品均与已知物种的同源序列分别聚为单系(除马来穿山甲)。过去菲律宾穿山甲常被认为是马来穿山甲的亚种, 分布区重叠因海平面上升导致其被地理隔离^[3], 马来穿山甲种群具有较高的遗传多样性。且该研究中菲律宾穿山甲的样本量较少, 需要进一步增加其 *Cytb* 基因单倍型, 以确定它们之间的关系^[26]。序列长度发生改变时系统发育树部分分支的置信度值, 甚至整个拓扑结构都会产生一定差异^[43]。前 3 组序列构建的系统发育树将亚洲穿山甲和非洲穿山甲分为独立分支, 这与线粒体基因组构建的系统发育树^[11]结构相同; 而 MJ-DCW 构建的系统发育树则与之不同; 且 4 组序列随着序列长度变小, 其各物种分支的置信度有变小的趋势。因此, 利用系统发育树法鉴别物种时要考虑序列长度对结果判读的影响。



注:节点后验概率/自举值从上至下依次为 MJ-L、MJ-M、MJ-S;不包含外群。

Note: The posterior probability/boot strap value are MJ-L, MJ-M, MJ-S from top to bottom; out groups are not included in the phylogenetic tree.

图 3 基于 MJ-L 构建系统发育树
Fig. 3 Phylogenetic tree based on MJ-L

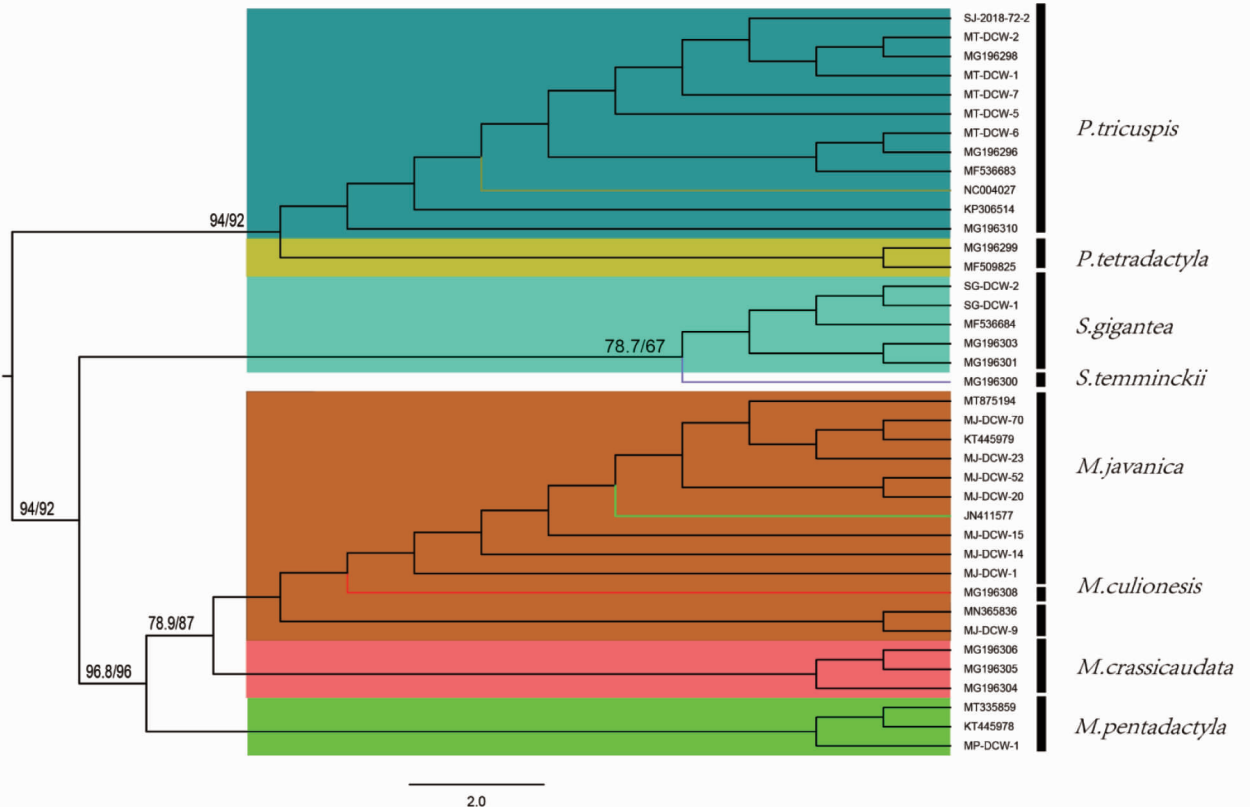


图 4 基于 MJ-DCW 构建系统发育树 (不包含外群)

Fig. 4 Phylogenetic tree based on MJ-DCW (excluded out groups)

参考文献

- [1] 黄飘逸, 彭建军, 高红梅, 等. 西南地区野生穿山甲资源现状及药材贸易市场调查[J]. 林业科技通讯, 2019(10): 34-36.
- [2] GAUDIN T J, EMRY R J, WIBLE J R. The phylogeny of living and extinct Pangolins (Mammalia, Pholidota) and associated taxa: A morphology based analysis[J]. Journal of mammalian evolution, 2009, 16(4): 235-305.
- [3] GAUBERT P, ANTUNES A. Assessing the taxonomic status of the Palawan pangolin *Manis culionensis* (Pholidota) using discrete morphological characters[J]. Journal of mammalogy, 2005, 86(6): 1068-1074.
- [4] NOWAK R M, WALKER E P. Walker's mammals of the world[M]. 5th ed. Baltimore, Maryland, USA: Johns Hopkins University Press, 1991: 536-538.
- [5] WILSON D E, REEDER D M. Mammal species of the world: A taxonomic and geographic reference[M]. 2nd ed. Washington: Smithsonian Institution Press, 1993.
- [6] 胡杰, 胡锦涛. 哺乳动物学[M]. 深圳: 中国教育文化出版社, 2007: 90.
- [7] 胡诗佳, 彭建军, 于冬梅, 等. 中华穿山甲的研究及保护现状[J]. 四川动物, 2010, 29(4): 673-675.
- [8] 涂丽梅, 阳莉君. 浅谈野生穿山甲的保护现状与研究[J]. 吉林畜牧兽医, 2019, 40(5): 74-75.
- [9] 任倩俐. 穿山甲生存现状及保护前景[J]. 当代畜牧, 2020(1): 58-60.
- [10] 吴诗宝, 马广智, 唐玫, 等. 中国穿山甲资源现状及保护对策[J]. 自然资源学报, 2002, 17(2): 174-180.
- [11] GAUBERT P, ANTUNES A, MENG H, et al. The complete phylogeny of pangolins: Scaling up resources for the molecular tracing of the most trafficked mammals on earth[J]. Journal of heredity, 2018, 109(4): 347-359.
- [12] 辛翠娜, 彭建军, 王莹, 等. *Cytb* 分子标记技术在物种鉴定中的应用[J]. 野生动物, 2009, 30(4): 217-221.
- [13] COISSAC E, HOLLINGSWORTH P M, LAVERGNE S, et al. From barcodes to genomes: Extending the concept of DNA barcoding[J]. Molecular ecology, 2016, 25(7): 1423-1428.
- [14] HASSANIN A, HUGOT J P, VAN VUUREN B J. Comparison of mitochondrial genome sequences of pangolins (Mammalia, Pholidota)[J]. Comptes rendus biologiques, 2015, 338(4): 260-265.
- [15] 尹艳, 刘逊, 王兵, 等. 中药穿山甲的 DNA 分子鉴定研究[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(11): 2078-2084.
- [16] 邵建宏, 蒋晓霞, 徐博文, 等. 亚洲穿山甲实时荧光 PCR 鉴定方法的研究[J]. 经济动物学报, 2022, 26(1): 23-28.
- [17] 张壹萱, 涂飞云, 韩卫杰, 等. 基于线粒体基因对穿山甲鳞片及犀牛角物种鉴定[J]. 南方林业科学, 2020, 48(4): 75-78.
- [18] GAUBERT P, ANTUNES A. What's behind these scales? Comments to "The complete mitochondrial genome of Tem minck's ground pangolin (*Smutsia temminckii*, Smuts, 1832) and phylogenetic position of the Pholidota (Weber, 1904)"[J]. Gene, 2015, 563(1): 106-108.
- [19] PRADO M, CALO-MATA P, VILLA T G, et al. Co-amplification and sequencing of a cytochrome *b* fragment affecting the identification of cattle in PCR-RFLP food authentication studies[J]. Food chemistry, 2007, 105(1): 436-442.
- [20] HUA Y, WANG J, AN F Y, et al. Phylogenetic relationship of Chinese pangolin (*Manis pentadactyla aurita*) revealed by complete mitochondrial genome[J]. Mitochondrial DNA part B, 2020, 5(3): 2523-2524.
- [21] QIN X M, DOU S R, GUAN Q X, et al. Complete mitochondrial genome of the *Manis pentadactyla* (Pholidota, Manidae): Comparison of *M. pentadactyla* and *M. tetradactyla*[J]. Mitochondrial DNA, 2012, 23(1): 37-38.
- [22] NASH H C, WIRDATETI, LOW G W, et al. Conservation genomics reveals possible illegal trade routes and admixture across pangolin lineages in Southeast Asia[J]. Conservation genetics, 2018, 19(5): 1083-1095.
- [23] DU TOIT Z, DU PLESSIS M, DALTON D L, et al. Mitochondrial genomes of African pangolins and insights into evolutionary patterns and phylogeny of the family Manidae[J]. BMC genomics, 2017, 18(1): 746-759.
- [24] DU TOIT Z, GROBLER J P, KOTZÉ A, et al. The complete mitochondrial genome of tem minck's ground pangolin (*Smutsia temminckii*; Smuts, 1832) and phylogenetic position of the Pholidota (Weber, 1904)[J]. Gene, 2014, 551(1): 49-54.
- [25] ARNASON U, ADEGOKE J A, BODIN K, et al. Mammalian mitogenomic relationships and the root of the eutherian tree[J]. Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America, 2002, 99(12): 8151-8156.
- [26] GAUBERT P, MACHORDOM A, MORALES A, et al. Comparative phylogeography of two African carnivores presumably introduced into Europe: Disentangling natural versus human-mediated dispersal across the Strait of Gibraltar[J]. Journal of biogeography, 2011, 38(2): 341-358.
- [27] VERMA S K, SINGH L. Novel universal primers establish identity of an enormous number of animal species for forensic application[J]. Molecular ecology notes, 2003, 3(1): 28-31.
- [28] TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, et al. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. Molecular biology & evolution, 2011, 28(10): 2731-2739.
- [29] KIMURA M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide-sequences[J]. Journal of molecular evolution, 1980, 16(2): 111-120.
- [30] ZHANG D, GAO F L, JAKOVLCI I, et al. PhyloSuite: An integrated and scalable desktop platform for streamlined molecular sequence data management and evolutionary phylogenetics studies[J]. Molecular ecology resources, 2020, 20(1): 348-355.
- [31] LOPEZ-OCEJA A, GAMARRA D, BORRAGAN S, et al. New *cyt b* gene universal primer set for forensic analysis[J]. Forensic science international: Genetics, 2016, 23: 159-165.
- [32] 黄如琳. 12S rRNA、*Cyt b* 基因标记在几类野生动物检材鉴定中的差异[J]. 四川农业大学学报, 2017, 35(2): 273-279.
- [33] IRWIN D M, KOCHER T D, WILSON A C. Evolution of the cytochrome *b* gene of mammals[J]. Journal of molecular evolution, 1991, 32(2): 128-144.
- [34] KIM J I, DO T D, LEE D L, et al. Application of cytochrome *b* gene sequences for identification of parrots from Korean Zoos[J]. Korean journal of biological sciences, 2020, 36(3): 216-221.
- [35] CAMACHO C, COULOURIS G, AVAGYAN V, et al. BLAST+: Architecture and applications[J]. BMC bioinformatics, 2009, 10: 1-9.
- [36] KYLE C J, WILSON C C. Mitochondrial DNA identification of game and harvested freshwater fish species[J]. Forensic science international, 2007, 166(1): 68-76.
- [37] ALBACH D C, LI H Q, ZHAO N, et al. Molecular systematics and phytochemistry of *Rehmannia* (Scrophulariaceae)[J]. Biochemical systematics and ecology, 2006, 35(5): 293-300.
- [38] DINH T D, NGATIA J N, CUI L Y, et al. Influence of pairwise genetic distance computation and reference sample size on the reliability of species identification using *Cyt b* and *COI* gene fragments in a group of native passerines[J]. Forensic science international: Genetics, 2019, 40: 85-95.
- [39] AVISE J C. Molecular markers, natural history and evolution[M]. New York: Chapman and Hall, 1994: 511.
- [40] 曹祥荣, 束峰珏, 张锡然, 等. 毛冠鹿与 3 种麂属动物的线粒体细胞色素 *b* 的系统进化分析[J]. 动物学报, 2002, 48(1): 44-49.
- [41] 杨学干, 王义权, 周开亚, 等. 从细胞色素 *b* 基因序列探讨我国林蛙属动物的系统发生关系[J]. 动物学研究, 2001, 22(5): 345-350.
- [42] HEBERT P D, PENTON E H, BURNS J M, et al. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astrartes fulgurator*[J]. Proceedings of the national academy of sciences, 2004, 101(41): 14812-14817.
- [43] 伊珍珍, 陈子桂, 高珊, 等. 旋唇纲纤毛虫系统发育分子树构建的影响因素[J]. 动物学报, 2007, 53(6): 1031-1040.