



被《国际濒危野生动植物种进出口贸易公约》(CITES) 列为附录 II 物种, 被国际自然与自然资源保护联盟 (IUCN) 红皮书列为易危种 (VU), 中国濒危动物红皮书将其列为濒危 (E) (World Conservation Monitoring Center, 1994)。据颁布的“亚洲灵长类保护行动计划”, 黑叶猴属 9 级优先保护者, 在亚洲叶猴属中是保护等级最高的物种 (陈智, 2006)。

贵州作为野生黑叶猴分布数量最多的地区 (王应祥等, 1999; 胡刚, 2011), 历史上自东北向西南沿石灰岩地区连续分布, 分布区包括绥阳、正安、道真、务川、沿河、桐梓、兴义、安龙、册亨、贞丰、六盘水等县市 (罗蓉等, 1993); 但目前仅存于绥阳、道真、沿河、水城四县的狭小地域, 共有 132-137 群, 约 1 160-1 200 只 (胡刚, 2011)。目前贵州省黑叶猴的分布格局呈现出明显的斑块化, 且各斑块之间没有生态廊道的连接, 各区域种群之间缺乏基因交流, 开展贵州省野生黑叶猴种群遗传多样性的研究, 对制定合理科学的喀斯特石山黑叶猴物种保护措施具有重要的指导意义。

本研究采用线粒体分子标记技术对贵州东北部

地区野生黑叶猴的遗传多样性进行研究, 研究结果有助于查明贵州省野生黑叶猴在遗传水平上是否已经濒临灭绝, 种群的适应能力及进化潜力的高低。本研究填补了贵州野生黑叶猴在遗传学研究上的空白, 并在此基础上分析了贵州东北部黑叶猴种群濒危的可能原因和机制, 从分子遗传学角度为黑叶猴种群有效保护和遗传管理方案的制定提供了科学和切实可行的参考依据。

## 1 研究方法

### 1.1 样品采集

采用非损伤性取样 (Noninvasive sampling) (Taberlet *et al.*, 1999; 李明等, 2001) 方法, 对贵州东北部地区的绥阳县宽阔水国家级自然保护区、道真县大沙河省级自然保护区和沿河县麻阳河国家级保护区野生黑叶猴粪便样品进行采集, 将采到的样品分别放入离心管 (50 mL) 中, 加入无水乙醇 (30 mL) 保存。具体采集地点及数量见表 1。

另外, 采集了贵阳市黔灵公园笼养黑叶猴 (均来自绥阳) 的 22 个粪便及 5 份毛发样品, 以弥补野外采集样品的局限性。

表 1 黑叶猴样品数和采集地

Table 1 Sample numbers and collection sites of *Trachypithecus francoisi*

| 采集地点及其地理坐标<br>Collection sites and geographic coordinate |                        |                         | 采集时间<br>Collection time      | 样本数<br>No. of samples | 样品类型<br>Sample type | 总计<br>Total |
|--|------------------------|-------------------------|------------------------------|-----------------------|---------------------|-------------|
| 绥阳宽阔水<br>Suiyang Kuankuoshui                             | 烟灯岩<br>Yandengyan      | 107°8'40"E, 28°10'28"N  | 2008. 3 - 2008. 6            | 15                    | 粪便 Feces            | 21          |
|  | 苏家沟<br>Sujiagou        | 107°10'34"E, 28°11'18"N |                              | 6                     | 粪便 Feces            |             |
| 道真大沙河<br>Daozhen Dashahe                                 | 仙女洞<br>Xiannvdong      | 107°35'29"E, 29°7'32"N  | 2008. 8                      | 16                    | 粪便 Feces            | 16          |
| 沿河麻阳河<br>Yanhe Mayanghe                                  | 猴王洞<br>Houwangdong     | 108°9'51"E, 28°41'37"N  | 2008. 4 - 2008. 6<br>2008. 8 | 21                    | 粪便 Feces            | 42          |
|  | 老鹰洞<br>Laoyingdong     | 108°13'43"E, 28°37'54"N |                              | 13                    | 粪便 Feces            |             |
|  | 香坝沟洞<br>Xiangbagoudong | 108°14'27"E, 28°39'34"N |                              | 8                     | 粪便 Feces            |             |
| 贵阳黔灵公园<br>Guiyang<br>Qianling Park                       | 绥阳<br>Suiyang          | 106°43'12"E, 26°34'12"N | 2007. 10 - 2008. 2           | 22                    | 粪便 Feces            | 27          |
|  |                        |                         |                              | 5                     | 毛发 Hair             |             |

## 1.2 基因组 DNA 提取

### 1.2.1 粪便 DNA 提取

提取方法由中国科学院动物研究所灵长类研究组提供(Zhang *et al.*, 2006)。充分振荡样品,取适量悬浊液于 15 mL 离心管,高速离心后弃上清液;加入 10 mL 的无水乙醇,混匀、离心弃上清液;重复多次至上清无色后自然干燥。加入 3 mL 的消化液(0.5 mol/L EDTA pH8.0, 1 mol/L Tris-HCl pH8.0, 10% SDS pH7.2)和 60  $\mu$ L pK (200 mg/mL 蛋白酶 K),混匀,55 $^{\circ}$ C 水浴 10–15 h 进行消化过夜;消化后 3 800 r/min 离心 10 min 取上清液,注入有小于 3 g 淀粉的 15 mL 离心管中混匀、离心;取上清液于新的 2.0 mL 离心管中,加入 200  $\mu$ L CTAB buffer,70 $^{\circ}$ C 水浴 10 min;加入等体积的酚/氯仿-异戊醇(25:24:1)抽提,10 000 r/min 离心 10 min,吸取上清液放入新的离心管;重复 2–3 次;使用 PCR 产物纯化试剂盒 E. Z. N. A. Cycle-pure Kit(USA, Omega 公司)纯化抽提产物,纯化产物用 100  $\mu$ L 超纯水洗脱,–20 $^{\circ}$ C 保存。

### 1.2.2 毛发样品 DNA 提取

参考赵春江和李宁(2003)的毛发 DNA 提取方法,并加以改进。选取 5 根带毛囊的毛发于 200  $\mu$ L PCR 管中(毛囊端置于 PCR 管底部),剪去毛发高于试管的部分,70% 乙醇清洗毛发 2 次(去油脂),再用去离子水冲洗毛发 2 次(去杂质),设置一个空白对照管。在每个试管中加 50  $\mu$ L 配制好的毛囊裂解液(50 mmol/L KCl, 10 mmol/L Tris-HCl, 0.01% 明胶, MgCl<sub>2</sub> 2 mmol/L 和蛋白酶 K 100 mg/L)。另外,在 PCR 仪上设置一个单循环程序:65 $^{\circ}$ C 120 min, 95 $^{\circ}$ C 30 min, 4 $^{\circ}$ C 10 min。将上一步骤中的 PCR 试管放入预热好的 PCR 仪中,运行该程序。程序结束后,将 PCR 试管进行瞬时离心,将反应后的液体吸至另一干净的 PCR 管中,即为所需的 DNA 溶液,可立即使用,也可置于 –20 $^{\circ}$ C 保存。

为了检验提取的 DNA 质量,将抽提的总 DNA 在 1.2% 琼脂糖凝胶上电泳检测。

### 1.3 线粒体 DNA 的扩增

引物引用系依据滇金丝猴线粒体控制区的保守区域的序列设计(Liu *et al.*, 2007): GH (5' – AAC TGG CAT TCT ATT TAA ACT AC – 3')、GL (5' – ATT GAT TTC ACG GAG GAT GGT – 3')。

PCR 扩增反应在 40  $\mu$ L 的反应体积中进行,其中含 20  $\mu$ L Premix TaqE (包括 TaqE、10 $\times$  loading buffer、dNTP 和 Mg<sup>2+</sup>), BSA (10 mg/mL) 3  $\mu$ L, 正、反引物 (0.4 mmol/L) 各 1.5  $\mu$ L, 模板 DNA (500 ng/ $\mu$ L) 4  $\mu$ L, 超纯水 10  $\mu$ L。反应条件为 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 共进行 48 个循环,反应前在 94 $^{\circ}$ C 预变性 10 min, 反应结束后在 72 $^{\circ}$ C 下延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。

所得 PCR 产物采用 1.5% 的常规琼脂糖凝胶电泳检测,将得到的 PCR 扩增产物送北京诺赛基因公司进行纯化测序。

### 1.4 序列分析

测序结果通过 NCBI 上进行相似性比对甄别后,使用 Clustal X (1.83) (Jeanmougin *et al.*, 1998) 软件进行同源比对,辅以人工核对校正。用 DNMBE 软件确定单倍型;利用 MEGA4.0 软件包分析序列特征、统计碱基组成和转换与颠换值、变异位点等,基于 Kimura 双参数法计算单倍型间的遗传距离。

由于 D-loop 序列中的简约信息位点较少,我们选择邻接法 (Neighbor joining, NJ) 和最大似然法 (Maximum likelihood, ML) 构建系统发育树,以郁乌叶猴 (*Trachypithecus obscurus*)、黑脊叶猴 (*Presbytis melalophos*) 和白臀叶猴 (*Pygathrix nemaeus*) 做外群,GenBank 号分别为 AY863425、DQ355299、EU004481。并引用 Liu 等 (2013) 的广西黑叶猴的相应序列与贵州东北部黑叶猴的序列构建系统发育树。ModelTest 显示数据在 HKY + I 模型下的似然值最大,因此我们使用此模型来构建系统发育树。系统发育树用 PAUP 4.0b10 软件 (Swofford, 2002) 构建。在构建 ML 和 NJ 之前,使用 ModelTest 3.06 (Posada and Crandall, 1998) 对碱基替换模型进行选择,并进行 1 000 次的重抽样 (boot2strap)。

## 2 结果

从毛发和粪便样品中,均成功提取到基因组 DNA 并得到特异性的扩增产物,共获得 88 个个体的测序结果用于分析研究(粪便样品的扩增成功率为 82.2%,毛发样品的扩增成功率为 80.0%),空白对照实验未出现扩增产物。将扩增测序得到的序列分别在 GenBank 上进行同源比对,结果与黑

叶猴 D-loop 同源区的序列相似度为 96%，证实测序结果确系目的片段。

### 2.1 黑叶猴 mtDNA D-loop 区部分序列单倍型分析

在长度为 395 bp 的 D-loop 区片段中，共发现 30 个变异位点，占分析序列长度的 7.6%，碱基突变形式为转换和颠换，没有出现碱基插入和缺失现象。得到的 30 个多态性变异位点定义了 6 个单倍型（表 2），其中绥阳 2 个（GZ1，GZ2），道真

2 个（GZ3，GZ4），沿河 1 个（GZ4），黔灵公园笼养种群 3 个（GZ2，GZ5 和 GZ6），沿河麻阳河的 4 个猴群与道真共享 1 个（GZ4），黔灵公园与绥阳共享 1 个（GZ2）。各单倍型之间的平均遗传距离（P）为 0.028，单倍型 GZ2 和 GZ4，GZ4 和 GZ6 表现出最小遗传距离 0.003，而 GZ5 与各单倍型间遗传距离最大，平均值高于 0.05（表 3）。

表 2 黑叶猴线粒体控制区多态位点分布

Table 2 Distribution of polymorphism sites within the mitochondrial control region of François' langurs

| 单倍型<br>Haplotype | 多态位点 Polymorphic sites                    |  |  |  |  |  |  |  |  |  | Genbank 编号<br>Genbank NO. | 种群共享单倍型个数<br>The number of shared haplotypes for populations |               |             |                       |
|------------------|---|--|--|--|--|--|--|--|--|--|---------------------------|--|---------------|-------------|-----------------------|
|                  | * * * * *                                 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |                           |  |               |             |                       |
|                  | [ 0111111112 222222223 333333333 ]        |  |  |  |  |  |  |  |  |  |                           | 绥阳   |               |             |                       |
|                  | [ 858899990 0022355570 2334455679 ]       |  |  |  |  |  |  |  |  |  |                           | 道真   |               |             |                       |
|                  | [ 5806345682 4548302814 9166714633 ]      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |                           | 绥阳<br>Suiyang  | 道真<br>Daozhen | 沿河<br>Yanhe | 黔灵公园<br>Qianling Park |
| GZ1              | CGCATTCCTTGGCACTCGCGTGGTCTTACA            |  |  |  |  |  |  |  |  |  | GU329943                  | 1  |               |             |                       |
| GZ2              | ..... AA..... A. A..... T                 |  |  |  |  |  |  |  |  |  | GU329944                  | 1  |               |             | 1                     |
| GZ3              | ..... AA. T..... AA..... T                |  |  |  |  |  |  |  |  |  | GU329945                  |  | 1             |             |                       |
| GZ4              | ..... AA..... A..... T                    |  |  |  |  |  |  |  |  |  | GU329946                  |  | 1             | 1           |                       |
| GZ5              | ..... CT. . CACT. TC. A. AC. . C. . . TTT |  |  |  |  |  |  |  |  |  | GU329948                  |  |               |             | 1                     |
| GZ6              | .. T..... AA..... A..... T                |  |  |  |  |  |  |  |  |  | GU329949                  |  |               |             | 1                     |

\* 为简约位点；“.”表示与第一个单倍型（GZ1）有相同的碱基组成

\* refers to parsimonious sites；‘.’ represents identity with haplotype GZ1

表 3 黑叶猴 mtDNA 控制区 6 种单倍型序列差异百分比（对角线以下）和单倍型之间遗传距离（Kimura-2-parameter）（对角线以上）

Table 3 Percentage of sequence divergence (below diagonal) and Kimura 2-parameter distance between haplotypes (above diagonal) of François' langurs by portions of mtDNA control region

|     | GZ1  | GZ2   | GZ3   | GZ4   | GZ5   | GZ6   |
|-----|------|-------|-------|-------|-------|-------|
| GZ1 |      | 0.013 | 0.015 | 0.010 | 0.039 | 0.013 |
| GZ2 | 1.27 |       | 0.008 | 0.003 | 0.034 | 0.005 |
| GZ3 | 1.51 | 0.76  |       | 0.005 | 0.042 | 0.008 |
| GZ4 | 1.01 | 0.25  | 0.51  |       | 0.037 | 0.003 |
| GZ5 | 3.80 | 3.29  | 4.05  | 3.54  |       | 0.039 |
| GZ6 | 1.27 | 0.51  | 0.76  | 0.25  | 3.80  |       |

### 2.2 贵州黑叶猴系统发育树

我们采用不同的聚类方法分别在两种空间尺度：单倍型水平（县，小空间尺度）和种群水平（省，大空间尺度）上构建了贵州东北部黑叶猴的系统发育树。由于 ML 树和 NJ 树的拓扑结构基本一致，这里只绘出 NJ 树（图 2）。在以种群构建的系统树中，来源于绥阳、道真和沿河地区及黔灵公

园笼养的黑叶猴种群中的单倍型，在系统树中因采样点距离非常靠近，所以并未按照采样地区严格聚类，没有形成明显的群组，相互混杂，未发现明显的分化。在大空间尺度上，来自贵州东北部和广西的黑叶猴单倍型严格聚类，但在小空间尺度上，来自各县的单倍型并未按照采样地区严格聚类。

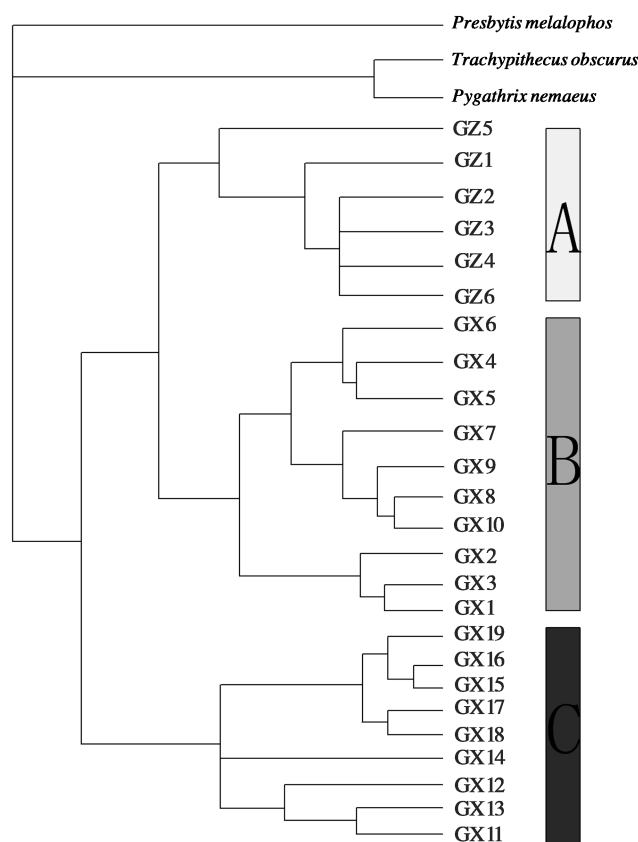


图2 贵州东北部黑叶猴与广西黑叶猴 mtDNA 控制区部分序列构建的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic trees based on sequences of the François' langurs' mtDNA control region in northeast of Guizhou and Guangxi

从系统发育树看出，贵州与广西的黑叶猴主要分成3个（A、B、C）单倍群，C枝的广西黑叶猴是最早分化独立出来的一枝，而贵州黑叶猴（A枝）与广西黑叶猴（B枝）是在较晚的时候分枝（图2），表明黑叶猴种群的扩散是由南到北逐渐分化的。贵州的黑叶猴虽然分支比较晚一些，但目前贵州黑叶猴的单倍型特有，是一支独立的单元群。

### 3 讨论

单倍型间的平均遗传距离（P）是衡量一个种群 mtDNA 遗传多样性的重要指标。大多数哺乳动物的P值都在0.01以上，通常认为它们的种内变异较大；如P值低于0.01，被认为缺乏种内变异（Lan and Shi, 1993）。本研究中贵州东北部地区黑叶猴6种单倍型间的平均遗传距离为0.028，大于0.01，说明此地区黑叶猴种内遗传变异较大，携带较丰富的遗传信息，遗传多样性较高。黑叶猴在贵州省曾连续分布（罗蓉等，1993；李明晶，1995），目前分布区域的隔离仅有20多年，本研究

中的黑叶猴遗传多样性较高，表明贵州省黑叶猴东北部各区域种群间还未发生遗传漂变；在近年的种群数量调查研究中，贵州省黑叶猴各区域种群数量并未有显著的下降，也反映了贵州省黑叶猴遗传多样性较高（杨乐，2008；胡刚，2011）。

20世纪90年代以前，黑叶猴在贵州省的11个县连片分布（罗蓉等，1993；李明晶，1995），由于近年来人类生产生活的影响，栖息地破碎化严重，形成了目前仅分布于4个县狭小区域的格局。在我们发现的6个单倍型中，沿河、道真和绥阳野生种群占4个，其中沿河的4个猴群只存在1个单倍型（GZ4）且该单倍型与道真种群共享。在贵州省黑叶猴历史分布区域，沿河与道真之间的正安、务川有黑叶猴分布（罗蓉等，1993），说明这两个地区的黑叶猴种群在历史上有着一定程度的联系，而现在沿河与道真有一个共同的单倍型，可能是两地种群地理隔离形成较晚所致。

本文聚类分析结果中贵州东北部各黑叶猴种群聚为一个大的支系，与广西种群遗传关系较远，表

明在大空间尺度上, 黑叶猴很难发生种群间的基因交流, 地理距离能比较正确的反映遗传距离之间的关系。贵州东北部黑叶猴作为一个独立进化的单元群应加强保护。但目前黑叶猴保护区中薪柴砍伐、家畜放养等人为干扰仍很常见, 特别是不通公路的村寨中更为普遍, 由此导致黑叶猴的栖息地进一步破碎化(胡刚, 2011), 为喀斯特石山地区的野生黑叶猴保护带来更大的困难。

栖息地的破碎化会导致野生动物遗传多样性降低, 人为干扰是造成栖息地破碎化的主要因素。经济发展和野生动物保护之间具有一定的冲突, 在一定程度上影响了人与动物和谐相处, 为保护工作带来消极作用。为此, 应在贵州黑叶猴保护区内探索发展生态农业及社区共管的新型管理模式, 建立生态廊道, 以实现贵州东北部不同地区黑叶猴种群间的基因交流, 只有这样才能真正有效的保护黑叶猴的种群数量和遗传多样性。

**致谢:** 样品采集得到了沿河麻阳河国家级自然保护区、绥阳宽阔水自然保护区和道真大沙河自然保护区的大力支持, 以及冯高魁、龙剑坤等人的大力帮助; 实验过程中得到中科院动物研究所保护和生态遗传研究组李明研究员、刘志瑾副研究员, 研究生郝艳丽、王博石、罗茂芳、孙涛的指导和帮助, 特此一并致谢。

#### 参考文献:

- Eudey A A. 1987. Action plan Asia primate conservation. IUCN - The World Conservation Union.
- Groves P C. 2001. Primate Taxonomy. Washington and London: Smithsonian Institution Press, 53 - 67.
- Jeanmougin F, Thompson J D, Gouy M, Higgins D G, Gibson T J. 1998. Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends Biochemical Sci*, **23** (10): 403 - 405.
- Lan H, Shi L M. 1993. The origin and genetic differentiation of native breeds of pigs in southwest China: an approach from mitochondrial DNA polymorphism. *Biochemical Genetics*, **31** (1 - 2): 51 - 60.
- Li M, Wei F W, Rao G, Fang S G, Feng Z J. 2001. Application of noninvasive sampling in conservation on genetics. *Acta Zoologica Sinica*, **47** (3): 338 - 342. (in Chinese)
- Liu Z J, Ren B P, Long Y C, Hao Y L, Li M. 2007. Phylogeography and population structure of the Yunnan snub-nosed monkey (*Rhinopithecus bieti*) inferred from mitochondrial control region DNA sequence analysis. *Molecular Ecology*, **16** (16): 3334 - 3349.
- Liu Z J, Wang B S, Nadler T, Liu G J, Sun T, Huang C M, Zhou Q H, Zhou J, Que T C, Wang Z M, Roos C, Li M. 2013. Relatively recent evolution of pelage coloration in colobinae: phylogeny and phylogeography of three closely related langur species. *Plos One*, **8** (4): 1 - 10.
- Posada D, Crandall K A. 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, **14** (9): 817 - 818.
- Swofford D L. 2002. Paup 3 \*, Phylogenetic analysis using parsimony (\* and other methods) Version 4. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates.
- Taberlet P, Waits L P, Luikart G. 1999. Noninvasive genetic sampling: look before you leap. *Trends in Ecology and Evolution*, **14** (8): 323 - 327.
- Wang Y X, Jiang X L, Feng Q. 1999. Taxonomy, status and conservation of leaf monkeys in China. *Zoological Research*, **20** (4): 306 - 315. (in Chinese)
- World Conservation Monitoring Center. 1994. IUCN Red List of Threatened Animals. IUCN - The World Conservation Union.
- Wu H L, Fang S G. 2005. Mitochondrial DNA genetic diversity of black muntjac (*Muntiacus crinifrons*), an endangered species endemic to China. *Biochemical Genetics*, **43** (7): 407 - 416.
- Zhang B W, Li M, Ma L C, Wei F W. 2006. A widely applicable protocol for DNA isolation from fecal samples. *Biochemical Genetics*, **44** (6): 503 - 512.
- Zhao C J, Li N. 2003. A study of a brief protocol to extract DNA from hair. *Hereditas*, **25** (1): 69 - 70. (in Chinese)
- 王应祥, 蒋学龙, 冯庆. 1999. 中国叶猴类的分类、现状与保护. *动物学研究*, **20** (4): 306 - 315.
- 李明, 魏辅文, 饶刚, 方盛国, 冯祚建. 2001. 非损伤性取样法在保护遗传学研究中的应用. *动物学报*, **47** (3): 338 - 342.
- 李明晶. 1995. 贵州黑叶猴生态研究. 见: 夏武平, 张荣祖主编. 灵长类研究与保护. 北京: 中国林业出版社, 224 - 230.
- 赵春江, 李宁. 2003. 一种从毛发中提取 DNA 的简易方法. *遗传*, **25** (1): 69 - 70.
- 杨乐. 2008. 贵州和重庆黑叶猴生态学研究——种群、生境利用和保护. 昆明: 西南林学院硕士毕业论文.
- 陈智. 2006. 基于 3S 技术的生境破碎化研究. 桂林: 广西师范大学硕士毕业论文.
- 罗蓉, 谢家骅, 辜永河, 黎道洪. 1993. 贵州兽类志. 贵阳: 贵州科技出版社, 165 - 168.
- 胡刚. 2011. 我国黑叶猴资源分布与保护现状. *大自然*, **4**: 24 - 27.