

中文摘要

2021 年吉林省对朝口岸地区鼠类本底调查及其遗传特征研究

目的:

了解吉林省对朝口岸地区鼠类的种类构成、密度情况,确定吉林省对朝口岸地区鼠类分布情况,为该地区鼠种的输入性变化提供重要的数据支持。使用 DNA 条形码技术对鼠类和鼠类残缺样本进行鉴定,获得该地区鼠类的 DNA 条形码信息,为鼠类的准确鉴定提供进一步数据支持。

方法:

2021 年 6 月-11 月,选择吉林省对朝口岸地区内的琿春、长白、通化、延吉四个口岸下的口岸生活区、农田、林地生境监测地点,采用夹夜法捕获鼠类,每个生境共布置鼠夹 1000 夹,各口岸各共布置鼠夹 3000 夹。对鼠类进行分类及形态鉴定,同时利用 DNA 条形码技术进行鉴定:具体为解剖取鼠肝脏组织,提取鼠肝 DNA,针对 *COI* 和 *Cytb* 基因进行 PCR 扩增并对产物进行测序。针对测序结果利用 Mega 7.0 软件进行遗传距离分析和系统进化分析:采用 K2P 模型分别计算 *COI* 基因样本和 *Cytb* 基因样本的种内、种间遗传距离,采用邻接 (Neighbor Joining, NJ) 法、最大似然 (Maximum Likelihood, ML) 法分别构建 *COI* 基因样本和 *Cytb* 基因样本的系统发育进化树。

结果:

1.吉林省对朝口岸地区平均鼠密度为 4.36%。琿春口岸和长白口岸地区的鼠密度显著高于其他两个口岸地区。在不同生境中,林地生境鼠密度显著高于农田生境和口岸生活区生境的鼠密度,农田生境鼠密度显著高于口岸生活区生境的鼠密度。

2.吉林省对朝口岸地区共捕获鼠类 490 只,分别隶属于大仓鼠、大林姬鼠、褐家鼠、黑线姬鼠、花鼠、小家鼠、长尾仓鼠、长爪沙鼠、棕背鼯 9 种。琿春、延吉、长白口岸优势种群均为黑线姬鼠,通化口岸优势种群为褐家鼠。

3.吉林省对朝口岸地区中口岸生活区生境共捕获鼠类 42 只,优势种群为褐家鼠;农田生境共捕获鼠类 142 只,优势种群为褐家鼠;林地生境共捕获鼠类 306 只,优势种群为黑线姬鼠。

4. BLAST 比对的结果为 *COI* 基因与参考序列的同源性在 94.50%-100.00%，样本 *Cytb* 基因与参考序列的同源性在 99.07%-100.00%。基于 *COI* 基因的分子生物学鉴定与形态学鉴定结果的一致率为 90.00%，基于 *Cytb* 基因的分子生物学鉴定与形态学鉴定结果的一致率为 87.23%。使用同一样本同时进行基于 *COI* 和 *Cytb* 基因的分子生物学鉴定，得出 *Cytb* 基因鉴定与形态学鉴定结果的一致率（83.83%），略高于 *COI* 基因鉴定与形态学鉴定结果的一致率（61.61%）。

5. 计算 *COI* 基因样本和 *Cytb* 基因样本各自与部分参考序列样本的种内、种间遗传距离的结果为种间距离大于种内距离的 7-10 倍以上，用 NJ 法、ML 法分别构建 *COI* 基因和 *Cytb* 基因的系统发育进化树的结果都显示为各个鼠种能单独分为一个分支，从而能将不同属种的物种进行区分。结果中还包含了利用 DNA 条形码技术成功扩增的 3 只残缺鼠类样本的 *COI* 基因序列和 *Cytb* 基因序列，计算种内、种间遗传距离和构建进化树的结果也能根据不同属种的物种进行区分从而进一步确定残缺鼠类物种。

结论：

1. 吉林省对朝口岸地区各口岸鼠密度均大于 3%，其中珲春口岸和长白口岸地区的鼠密度显著高于其他两个口岸地区。吉林省对朝口岸地区不同生境的鼠密度存在差别，各生境的鼠密度由高到低依次为林地、农田、口岸生活区。吉林省对朝口岸地区优势种为黑线姬鼠和褐家鼠。吉林省对朝口岸地区各生境的优势种主要为黑线姬鼠和褐家鼠。

2. 对鼠类样本的 *COI* 基因和 *Cytb* 基因进行 BLAST 序列比对、遗传距离分析及系统发育分析能较为准确的进行物种的分类和鉴定，DNA 条形码技术能够纠正形态学鉴定的偏差，同时对残缺鼠类样本也能进行准确的分类和鉴定。DNA 条形码技术能够对常规和残缺样本的信息进行进一步挖掘。

关键词：

口岸； 鼠类； DNA 条形码； *Cytb* 基因； *COI* 基因

ABSTRACT

Background Survey and Genetic Characteristics of Rodents in the Port of Jilin Province Adjacent to DPRK in 2021

Objective:

To understand the species composition and density of rodents in the area of Jilin Province's bordering with North Korea, to determine the distribution of rodents in the area of Jilin Province's border crossing with North Korea, and to provide essential data to support the imported changes of rodent species in the area. DNA barcoding was used to identify rodents and rodents residual remains.

Methods:

From June to November 2021, the monitoring sites include residential areas, farmland and woodland habitats in close proximity to the ports of Hunchun, Changbai, Tonghua, and Yanji. Rodents were captured by using the clip-night method with a total of 1000 clips per habitat and 3000 clips per port. Rodents have been classified and morphologically identified, and DNA barcoding techniques have been used for species identification. Rodent liver tissue was dissected and extracted to detect *COI* and *Cytb* genes. PCR was performed on the *COI* and *Cytb* genes, and the amplified products were sequenced. Mega 7.0 software was used to perform genetic distance analysis and phylogenetic analysis for sequencing results: the K2P model was used to calculate the intraspecific and interspecific genetic distances of *COI* gene samples and *Cytb* gene samples, and the phylogenetic evolutionary trees of *COI* gene samples and *Cytb* gene samples were constructed respectively by Neighbor Joining(NJ) method and Maximum Likelihood (ML) method.

Results:

1. The average rodent density in Jilin Province to the Democratic People's Republic of Korea(DPRK) port area was 4.36%. The rodent density in Hunchun Port and Changbai Port area was significantly higher than that in the other two port areas. In different habitats, the density of rats in woodland habitats was significantly higher than that in farmland habitats and port living area habitats, and the rodent density in farmland habitats was significantly higher than that in port living area habitats.

2. A total of 490 rodents were captured in the port area of Jilin Province, belonging to 9 species of *Apodemus peninsulae*, *Rattus norvegicus*, *Apodemus agrarius*, *Sibiricus*, *Mus*

masculus, *Cricetulus longicaudatus*, *Meriones unguiculatus*, and *Clethrionomys rufocanus*. The dominant populations in Hunchun, Yanji and Changbai ports were all *Apodemus agrarius*, and the dominant populations at Tonghua Port were *Rattus norvegicus*.

3. A total of 42 rodents were captured in the habitat of the port living area in the port area of Jilin Province, and the dominant population was *Rattus norvegicus*. A total of 142 rodents were captured in farmland habitats, and the dominant population was *Rattus norvegicus*. A total of 306 rodents were captured in the woodland habitat, and the dominant population was the *Apodemus agrarius*.

4. The result of BLAST alignment was 94.50%-100.00% homology between *COI* gene with reference sequence, and 99.07%-100.00% homology between *Cytb* gene with reference sequence. The agreement rate between molecular biology and morphological identification results based on *COI* gene was 90.00%, and the consistency rate between molecular biology identification and morphological identification results based on *Cytb* gene was 87.23%. The same sample was used for simultaneous molecular biology identification based on *COI* and *Cytb* genes, and the consistency rate of *Cytb* gene identification and morphological identification results was obtained (83.83%), which was slightly higher than that of *COI* gene identification and morphological identification results (61.61%).

5. The results of calculating the intraspecific and interspecific genetic distance between *COI* gene samples and *Cytb* gene samples and some reference sequence samples are that the interspecific distance is greater than 7-10 times the intraspecific distance, and the results of constructing the phylogenetic evolutionary tree of *COI* gene and *Cytb* gene by NJ method and ML method respectively show that each mouse species can be divided into a separate branch, so that species from different genus and species can be distinguished. The results also included the *COI* gene sequence and *Cytb* gene sequence of three mutilated rodent samples successfully amplified by DNA barcoding technology, and the results of calculating the genetic distance within and between species and constructing an evolutionary tree could also be distinguished according to the species of different genera and species, so as to further determine the mutilated rodent species.

Conclusion:

1. The rodent density of all ports in Jilin Province was greater than 3%, and the rodent density in Hunchun Port and Changbai Port area was significantly higher than that in the other two port areas. In Jilin Province, there are differences in the density of rodents in different habitats in the port area of the DPRK, and the density of rodents in each habitat is

forest land, farmland and port living area in descending order. The dominant species in Jilin Province to the DPRK port area are *Apodemus agrarius* and *Rattus norvegicus*. The dominant species of habitats in the port area of Jilin Province are mainly *Apodemus agrarius* and *Rattus norvegicus*.

2. BLAST sequence comparison, genetic distance analysis, and phylogenetic analysis of *COI* genes and *Cytb* genes of rodents samples can accurately classify and identify species, and DNA barcoding can correct the biases in morphological identification while relatively accurately classifying and identifying mutilated rodents samples. DNA barcoding technology enables further mining of genetic information from both regular and mutilated samples.

Keywords:

ports; rodents; DNA barcoding; *Cytb* gene; *COI* gene

目 录

第 1 章 绪 论	8
1.1 病媒生物概况	1
1.1.1 病媒生物	1
1.1.2 全球病媒生物概况	1
1.1.3 我国病媒生物概况	2
1.1.4 鼠类与传染病	3
1.1.5 吉林省口岸病媒鼠类概况	3
1.2 线粒体 DNA 与 DNA 条形码研究概况	4
1.2.1 线粒体 DNA 简述	4
1.2.2 DNA 条形码	5
1.2.3 基于 DNA 条形码的数据分析方法	6
1.3 立题依据	9
第 2 章 材料与方 法	10
2.1 样本来源与采样方法	10
2.1.1 样本来源	10
2.1.2 采样时间	11
2.1.3 采样方法	11
2.2 仪器与试剂	11
2.2.1 主要仪器	11
2.2.2 主要试剂	12
2.3 内容与方 法	12
2.3.1 鼠类形态学鉴定过程	12
2.3.3 鼠类的 DNA 提取方法	13
2.3.4 基因片段扩增	13
2.3.5 序列测定与分析	14
2.3.6 鼠群数据分析与鼠类遗传特征分析	15
2.3.7 技术路线	16
第 3 章 结 果	17

3.1 鼠类监测结果.....	17
3.1.1 鼠密度.....	17
3.1.2 鼠类的种群构成.....	19
3.1.3 鼠类的分布.....	20
3.2 鼠类分子生物学鉴定结果.....	23
3.3 鼠类遗传特征分析.....	29
3.3.1 基于 <i>COI</i> 基因的遗传距离分析与进化树构建.....	29
3.3.2 基于 <i>Cytb</i> 基因的遗传距离分析与进化树构建.....	34
第4章 讨论.....	37
4.1 鼠类监测情况分析.....	37
4.2 鼠类分子生物学鉴定结果分析.....	38
4.3 鼠类遗传特征结果分析.....	39
4.4 不足与展望.....	41
第5章 结论.....	42
参考文献.....	43
附录.....	49
作者简介及在学期间所取得的科研成果.....	50
致谢.....	51

英文缩略词

英文缩写	英文名	中文名
<i>COI</i>	Cytochrome <i>c</i> Oxidase Subunit I	线粒体细胞色素 c 氧化酶 I
<i>Cytb</i>	Cytochrome b	细胞色素 b
ML	Maximum Likelihood	最大似然
NJ	Neighbor Joining	邻接
PCR	Polymerase Chain Reaction	聚合酶链式反应
DPRK	Democratic People's Republic of Korea	朝鲜民主主义共和国
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool	基于局部比对算法的搜索工具
MP	Maximum Parsimony	最大简约法
HFRS	Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome	肾综合征出血热
HTNV	Hantaan Virus	汉坦病毒

第1章 绪论

1.1 病媒生物概况

1.1.1 病媒生物

病媒生物在《中华人民共和国传染病防治法》给出的定义为：能够将病原体从人或其他动物直接或间接传播给人的生物。病媒生物包含脊椎动物与无脊椎动物，脊椎动物中的传播媒介主要为哺乳纲啮齿目中的鼠类等，无脊椎动物中的传播媒介主要为节肢动物门蛛形纲中的螨、蜱等和昆虫纲中的蝇、蚊、蚤、蜚蠊等。病媒生物及其传播的疾病对人类健康的危害严重，例如鼠类能传播肾综合征出血热、沙门氏菌病、钩端螺旋体病、斑疹伤寒等50余种疾病；蝇类和蜚蠊类动物能传播霍乱、原虫病（阿米巴痢疾）、细菌性痢疾、蛔虫病等多种肠道传染病；蚊类动物能传播多种传染病如疟疾、登革热、寨卡病毒病等；故病媒生物性疾病为人类严重的公共卫生问题之一^[1]。病媒生物性疾病与仅在人群间传播的传染病不同之处为其自然疫源地一般都存在特定的生物群落。因存在类型多样的病原体、数量众多的传播途径、种类繁多的宿主动物等众多因素，使得病媒生物性疾病的各个传播环节与流行情况复杂多变，防控部门难以对其进行有效地控制和消灭，长期以来病媒生物性疾病对患者的生命和财产都造成了沉重的负担^[2]。近年来，病媒生物所传播的传染病频繁爆发与流行，常见如由伊蚊传播的登革热、疟疾、黄热病等，由蜱传播的莱姆病等，由蚤和鼠类传播的鼠疫等，使得公众对病媒生物的关注度持续提高^[3]。由病媒生物传播的新发传染病近年来不断出现，各国往来日渐频繁，一旦发生各类公共卫生风险，对应的病媒生物性疾病就可以较为迅速地传遍全球，使得各国边境口岸的检疫风险有所加剧。

1.1.2 全球病媒生物概况

在全球化下的背景下，各国的经济日益腾飞，贸易合作更加紧密，跨国长途运输更加方便快捷，境外病媒生物的入侵事件也逐渐增多，从而使得最初仅在单一地区发生的病媒生物性疾病可通过各个国家的口岸和边境进行大范围的传播和扩散，对各国居民的健康形成不少的威胁^[4]。边境口岸的病媒生物监测与防治在保障出入境旅客的健康、预防和控制病媒生物及其所引发的传染病流入与传播等多方面都起到重要的作用^[5]。国际间货物运输的速度和频次的逐步提升，各类病媒生物可借助飞行器、轮船、火车等交通工具进行长距离移动，故也可造成各类病媒生物性疾病（如昆虫传播疾病）

的传播^[4]。在航运业的快速发展的背景下，各类传染病可借助大型远洋货轮而传播和扩散至欧洲、美洲和亚洲中的数个地区和国家，这些曾局限于某地的传染病可很快地扩散成世界范围内传播的流行病^[6]。1930年，在飞行器的帮助下，携带疟原虫的冈比亚按蚊被带往巴西，这一病媒生物的入侵直接导致巴西境内的疟疾流行并造成了南美洲多地疟疾的大流行^[6]。

从1970年至今，各国报道的病媒生物性疾病所导致的传染病疫情表现出快速上升的态势，当下病媒生物性疾病的预防和控制面临着一轮又一轮的新压力^[7-9]：病媒生物的分布范围有所扩大；病媒生物的生活习性、活动区域发生改变；人群的疾病发病率和流行强度不断增加；越来越便捷的交通运输工具，人员流动量日渐增大，病媒的扩散方式也呈现出多样化的趋势；大范围的不合理使用灭虫剂，使得病媒生物产生耐药性；各国报道的病媒生物性疾病的病例数量逐年增多，而且时常还能发现新病种，人类感染病媒所传播的疾病的风险也发生变化。各国政府因此依据各国国情制定并逐步完善病媒生物的控制策略和措施规范^[10]，如美国发布了西尼罗病毒监测、预防和控制的相关指南。此外，世界各国很多都根据当地的高风险病媒生物设置了针对性的防治部门与机构，例如在美国加利福尼亚州的洛杉矶县，当地设立5个蚊虫与媒介生物防治机构以进行蚊密度和蚊传疾病的监测；在英国的英格兰西米德兰兹郡，各个区议会下都建立了有害生物防治部，对各区内的居民提供除小家鼠外的免费灭鼠服务。

1.1.3 我国病媒生物概况

我国气候南北跨度广，跨越亚热带、热带、暖温带、寒温带和温带等5个气候带，病媒生物在各类交通工具的帮助下，可打破影响其传播和扩散的自然与地理环境的束缚后在各地生存与繁衍，使得各地的生态环境多样性容易遭到外来物种的入侵而被破坏，同时也对我国渔业、农业、养殖畜牧业、林业的生产劳作和居民健康负担造成较为严重的财产和健康损失。目前报道的入侵我国的外来物种超400种^[11]，世界自然保护联盟发布的全球最有威胁的100种外来入侵物种名单上，我国发现的上榜的外来物种有50多种^[12]。据报道，2002年我国全境的海关口岸截获病媒生物共有4类，总数量超37.8万只，在2003年截获的病媒生物共有7类，总数量超79.98万只，在2004年截获的病媒生物共有8类，总数量超216.15万只，在2005年截获的病媒生物共有8类，总数量超5223.67万只，上述病媒生物的源头国家和地区达122个，且截获数量逐年上升^[13]。至2009年，我国海关口岸报道的已明确的输入性病媒生物达640余种^[14]。病媒生物不

仅能传播上述的各类疾病，也能骚扰、吸血、寄生、致敏人畜，对农业、旅游业和通讯业等行业造成一定程度的破坏，对居民的日常生活造成影响^[15]。由于病媒生物客观上也促进了各类病媒生物性疾病的发生、发展和流行，故病媒生物被我国海关口岸纳入到输入性疫情的重点关注与防治对象中。通过对口岸地区进行病媒生物监测，了解该地区病媒生物的种群构成、种类密度、季节消长和病原携带情况，对传染病的发现和防治、提供防范物种入侵数据都有着重要意义。

1.1.4 鼠类与传染病

鼠传疾病是十分重要的一类病媒生物性疾病，其暴发和流行给人类的生产和生活造成了巨大的影响。鼠类是哺乳动物里种属数量较多、分布范围较广、种群数量较大、繁殖速度快且生存能力强的一类动物。现有研究表明，全世界鼠类共有35科389属，超2700种，在全球已确定分类的哺乳动物种类总数中鼠类占比高达42%^[16-17]，在我国的鼠类共有170余种。目前报道的鼠类能直接或间接传染给人类的57种疾病，包括有14种细菌性疾病、31种病毒性疾病、7种寄生虫病、5种立克次体病。它们也是许多自然疫源性疾病（如肾综合征出血热、鼠疫、钩体病）的中间宿主，并能向人类和家畜传播多达200余种的病原体^[18]。鼠传疾病的传播有直接和间接传播两种方式。直接传播主要有被鼠类咬伤或人类体表伤口直接暴露于鼠类排泄物而造成传播；间接传播主要由蚤、螨、蜱类等病媒造成的传播^[2]。

部分鼠类能够以多种疾病病原体的宿主形式存在，是由鼠类的生理学和生态学特征所决定，如对病原体的易感性、带毒率、以及宿主的分布特征、种群数量、排出病原体的途径等。不同鼠种所携带的优势病原体分型各不相同，所造成疾病的具体分型和危害后果也不全一致。另外，鼠类的种群数量变化、季节和年度波动及其带毒率增减等改变情况和人间部分疫情的流行强度有一定程度的关联。通过鼠类的本底调查及其种群相关的数据分析，摸清鼠类的组成、密度、季节波动等种群情况，对了解该地区鼠种输入性变化、鼠类传播疾病谱的改变及采取综合预防措施都具有较为重要的现实意义。

1.1.5 吉林省口岸病媒鼠类概况

中朝两国的边境线总长度约为1334公里，包括陆路交界长1289公里，水路交界长45公里^[19]，中朝边境地区为亚热带、温带地区，森林覆盖率较高，年降雨量较大，因

此地适合多种病媒生物的生存繁殖。近年来,随着对朝开放口岸的增加,输入性病媒生物性疾病传播的风险也不断增大。其中吉林省毗邻朝鲜,两地以鸭绿江、图们江为界,位于图们江流域的口岸有延吉和珲春口岸,位于鸭绿江流域的口岸有通化口岸和长白口岸,两江发源地都位于长白山山脉,但流向各自相反。目前吉林省对朝口岸中陆路口岸共有11个,中朝地区陆路口岸的直接接壤也为鼠类等病媒生物的迁移提供了便捷环境,也可进一步为外来物种的入侵提供途径。珲春圈河口岸位于图们江流域北部,经纬度为东经130°30′、北纬42°30′。该口岸距珲春市区约42公里,距图们江入海口约36公里,且为国际客货运输(一类)口岸,与朝鲜罗先市的元汀里口岸相接应,是中国与朝鲜罗先市直接相通的唯一通道。珲春口岸地区全年气候受海洋季风的影响较为显著,气候相对吉林省内陆地区更加温暖湿润,冬暖夏凉,位于中温带、近海洋性季风气候区,历年平均气温为5.65℃,自然环境与气候均适合鼠类等病媒生物生存和繁殖,为森林脑炎的自然疫源地^[20]。位于长白周边的长白口岸为国家一类口岸,该口岸地区与朝鲜惠山市隔江相望,全年平均气温较低,冬夏、昼夜温差较大,边境口岸地区森林覆盖面积较大。长白口岸地区是肾综合征出血热(HRFS)的自然疫源地,该病主要由汉坦病毒(Hantaan virus, HTNV)引起。在我国,HFRS主要由汉滩型汉坦病毒和汉城型汉坦病毒引起,对应的宿主分别是黑线姬鼠与褐家鼠^[21]。

1.2 线粒体 DNA 与 DNA 条形码研究概况

1.2.1 线粒体 DNA 简述

线粒体于1850年被瑞士-德国生物学家科里克发现,被德国生物学家卡尔·本达命名于1898年。作为真核生物细胞内十分重要的细胞器^[22],线粒体的生物学基本功能是利用氧化磷酸化的作用来产生腺嘌呤核苷三磷酸(ATP),从而给细胞所进行的生命活动供给能量,因此线粒体在新陈代谢的中有着重要地位。很多研究者把线粒体所独立拥有的这一套遗传信息系统称作真核细胞的第二遗传信息系统,或称为核外基因表达系统,但其自身只能合成10余种蛋白质,组成线粒体则需要1000余种蛋白质,故线粒体的功能需依赖核基因组的蛋白质编码的辅助^[23]。

线粒体DNA(mitochondrial DNA, mtDNA)为共价双链闭环DNA分子。线粒体基因组其中包含编码二十二个转运RNA(tRNA),两个核糖体RNA(12S rRNA与16S rRNA)、十三个蛋白质酶亚基编码基因:一个细胞色素b(*Cytb*)、三个细胞色素c氧化酶亚基(*COI*、

COI、*COI* II)、两个ATP酶亚基(ATP6、ATP8)和六个呼吸链复合体I (NADH)降解酶(ND1~6)^[24]。

1.2.2 DNA 条形码

病媒生物的物种鉴定的主要手段为形态学鉴定,该方法的主要是通过借助光学显微镜观察病媒生物的典型特征而进行物种鉴定。但鉴定过程中便于准确测量的定量指标较少,鉴定人员多从《中国口岸常见病媒生物鉴定图谱》、《中国动物志》中所列举的各物种特征对各病媒生物进行物种鉴定,若鉴定人员缺乏丰富的专业分类知识和实践经验,对部分残缺的样本和鼠类的新物种鉴定较为困难。郭刚^[2]等研究表明,使用DNA条形码进行物种鉴定虽可能会被网络数据库内上传的核酸序列信息所局限,但该方法有着可对形态学鉴定结果进行比对和复验的优点,故在物种鉴定中其有着作为形态学鉴定结果的补充的作用。

2003年,加拿大生物学家Hebert率先提出了DNA条形码这一概念^[25]。DNA条形码技术是选择一段标准的DNA序列片段作为不同物种的分子标记,从而对物种进行准确鉴定的分子生物学技术。常用到的DNA条形码分子标记为*COI*基因和*Cytb*基因。

*COI*即线粒体细胞色素c氧化酶I (Cytochrome *c* Oxidase Subunit I, *COI*), 因其在细胞内的拷贝数高,序列变异非常保守,获得技术比较简单,在同一物种内不同个体之间仅有1%~2%的序列差异,而近缘种间的序列差异较大,因而在动物界内物种的不同分类(如门、纲、目、科)上具有良好的识别效果,被推荐为动物界内物种鉴定的标准DNA条形码^[25]。

在线粒体内的13个编码蛋白质中,细胞色素b(Cytochrome b, *Cytb*)的结构、碱基的构成和功能等的研究目前了解较为透彻,其位于线粒体DNA(mtDNA)的H链^[26],同时包含了进化速度较慢与较快的密码子位点,编码含铁卟啉辅基的色蛋白^[27]。高等哺乳动物的*Cytb*基因序列总长度在1100-1300bp之间,在鼠类中该基因的序列总长度约1143bp,进化速率适中,表现为严格的母系遗传特征^[28-31]。早期针对该基因的研究主要集中于探究其对呼吸链的作用和机制^[32]。由于*Cytb*基因序列的长度适中、均一性较强,且同时包含了突变区和保守区,通过通用引物就能对其进行PCR扩增,可作为分子系统学的分子标记,因此常可利用*Cytb*基因开展遗传进化、系统分类以及物种鉴定等方面的研究。此外,相比于其他mtDNA基因,*Cytb*基因突变率高,并且在同一种内

不同个体之间、种间、属间等都存在遗传性差异，故*Cytb*基因在分子系统学研究中具有重要意义^[23]。

目前国外针对鼠类开展的调查与研究多集中于鼠类的种属鉴定、种群分布分析、地理分布分析、鼠类携带的病原微生物的检测、以及鼠类体外携带的寄生物调查等方面^[33]。如Ojeda^[34]等人借助DNA条形码在阿根廷境内的对鼠类动物开展研究，研究的内容主要为：在含有沙漠与山脉等不同地理条件的56个地区中对鼠类动物开展种类鉴定；Lakshminarayanan^[35]等人通过对*COI*基因进行测序并根据测序结果对啮齿动物做出准确的种类鉴定；Tamrin^[36]使用DNA条形码开展鼠类动物的物种鉴定研究并利用DNA条形码的核酸序列信息开展系统进化分析。国内不少研究者也对鼠类动物的种群构成、地理分布和病原体携带情况开展了监测与调查。如王安东^[37]对中国-哈萨克斯坦边境地区捕获的鼠类进行了基于DNA条形码技术的物种鉴定；周鹏程^[38]对江苏口岸捕获到的鼠类使用了*Cytb*基因片段进行物种鉴定；张勤^[39]，单振菊^[40]等人针对口岸拦截的形态特征被严重破坏的鼠类样本开展了基于DNA条形码的物种鉴定；齐润姿^[41]，王渊^[42]等人利用*COI*等DNA条形码对口岸捕获的鼠类进行分子生物学鉴定，并进行了序列特征的分析。林革^[43]等人使用了基于*Cytb*基因的DNA条形码技术对双峰口岸捕获的鼠类进行种属鉴定和系统发育分析。DNA条形码技术已被大量运用于鼠类等病媒生物的物种鉴定中，现已可以有力的支持物种形态学鉴定的结果^[25,44-46]。DNA条形码的主要局限于上传到NCBI中的BLAST序列比对数据库的样本不够充足，且不同数据库所覆盖的DNA条形码类型也不尽相同，不同的DNA条形码的物种鉴定结果也有可能存在差异，需要结合形态学鉴定结果进一步比较。国内外研究中涉及到多个DNA条形码鉴定效果对比的研究较少，通过各研究结果对比各个DNA条形码的鉴定效果则没有直接的参考意义。本研究通过选择鼠类样本常用的DNA条形码鉴定中的*COI*基因和*Cytb*基因，对其进行测序并进行序列比对进行物种鉴定，并将其与对形态学鉴定结果进行比对，从而起到探索各DNA条形码技术在实际鼠种鉴定工作中的应用情况。

1.2.3 基于 DNA 条形码的数据分析方法

作为DNA条形码技术中关键环节之一，DNA条形码的核酸序列数据分析的结果通常都较为准确，但对同个数据集采用不同的分析方法也可能产生各不相同的结果，故选择的DNA条形码序列数据分析方法会在一定程度上影响对最优对比DNA条形码

的选择。常用的DNA条形码序列数据分析方法有基于核酸序列相似性的分析方法、基于物种遗传距离的分析方法和基于系统发育进化树的分析方法。

(1) 基于核酸序列相似性的方法

BLAST (The Basic Local Alignment Search Tool)是国际上通用的序列分配比对算法,它是一种对核酸序列的相似性进行计算和比较的DNA条形码数据分析方法^[47],但一般不作为正式的物种鉴定的方法^[48]。这种方法需要大量物种的核酸序列的数据支撑,目前大家所熟悉的数据库有BOLD数据库、GenBank网络数据库、EMBL网络数据库和DDBJ网络数据库^[49]。其中,最为常用的国际数据库为GenBank网络数据库。主要分析步骤为:将fasta格式的序列数据输入到NCBI的BLAST网站(可连接到GenBank网络数据库)内,之后可以与数据库中的其他研究者上传的核酸序列进行相似性的搜索与比对,从而可匹配到与输入的序列数据匹配度(Identity Percent)较高的多组已知物种的核酸序列,可根据多组核酸序列物种的交叉验证,确证想要进行物种鉴定的DNA序列的物种,但结果的可信度存在不足^[50]。

(2) 基于物种遗传距离的方法

该方法通过构建不同的遗传距离统计模型,并通过该模型计算不同物种的DNA条形码核酸序列间的种内与种间的遗传距离,常用的统计分析模型有:基于P距离(P-Distance), Kimura2-Parameter(K2P)等^[51],通过比较各物种样本序列的种内与种间差异,确定种内与种间的阈值,分析物种的种内与种间变异。通常认为当种内遗传距离的最大值小于种间遗传距离的最小值时,那么可认为此DNA条形码为物种鉴定的理想条形码。但因不同物种在溯祖深度上存在差异,种内与种间距离的数值常有重叠从而导致无法区分物种^[52,53],故还需其他遗传分析方法参与到物种鉴定中。

(3) 基于系统发育进化树的方法

系统树(Phylogenetic Tree),又称进化树(Evolutionary Tree),树结构是通过多个进化分支(Branch)和结点(Node)组合而成,通过进化分支可确定各个分类单元之间的系统发生联系,一个分支只能连接两个相邻的结点,每一个结点可显示一个分类单元(基因、个体、种群、科、属等),包含树枝状分支的系统发育树可用来分析个体、物种间的亲缘关系。其中操作分类单位(Operational Taxonomic Units, OTU)指在处理系统发育树时,整个树分支的终节点(Terminal Nodes)或者末端。在描述生物各物种(或各物种以上)不同分类单元之间进化关系的各类方法中,最为直观的方法是建立系统进化树^[54]。

现如今的研究中多用到的系统发育进化树的构建方法可分为下列几种类型：基于距离法的有：非加权配对算术平均法(Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Mean, UPGMA)^[55]、邻接法(Neighbor Joining, NJ)^[56]、最小进化法(Minimum Evolution, ME)^[57]。基于奥卡姆(Ockham)原则的最大简约法(Maximum Parsimony, MP)^[58]、基于参数估计的最大似然法(Maximum Likelihood, ML)^[59]和基于蒙特卡洛模拟的贝叶斯法(Bayesian Inference, BI)^[60]。上述分析方法中常用的软件为PAUP*软件、DNAMAN软件、MEGA软件^[61]。

据文献报道,可以通过以下的几个标准来判断各个系统进化树模型是否合适与准确^[61]：(1) 系统发育树的统计检验；(2) 系统发育树的运算速度；(3) 真实拓扑结构的概率；(4) 拓扑结构估计值的一致性；(5) 系统发育树分支长度估计的可靠性。

对于各个建树方法在运算速度的比较中, NJ法和UPGMA法相较于其他方法更胜一筹, 这两种方法均可令计算机在短时间内快速完成多批量的核酸序列数据的处理, 进行自展检验(Bootstrap Method)也十分容易。现在计算机芯片的工艺水平已取得重要突破, 运算能力得到较大增强, 故这两种方法在计算速度上的优势已有所下降。

Felsenstein J.给出的一致估计的定义为：当某种建树方法所使用的核酸序列数目趋向于无穷大的情况下还能给出正确的树的, 那么此时该估计方法能被认为是一致估计^[60]。但该定义并不能符合规范严谨的统计学专业术语的表达。在对无偏核苷酸替换距离测度进行计算时, 使用ME、NJ等方法建树的结果都显示为一致估计^[62]。有报道指出, 在使用ML法建立系统发育树时, 选择合适的核苷酸替代模型的结果也可以认为是一致估计^[63,64], 但运用MP法建树的结果有时却不一致^[65,66]。故对建树方法的一致性估计还无法成为最重要的判断标准。

系统树分支长度估计的可靠性也作为非常关键的判断建树方法优劣的标准。如果能从目标序列数据计算出准确且稳定的拓扑结构, 那么也可以认为系统树分支长度估计的可靠性较高。目前建树方法中, 都可对NJ、ME和ML树进行分支长度估算, 但还不能对MP树进行分支长度估算, 故理论上上述三种建树方法所能给出的分支长度的可靠性要比MP树法更高。

评估建树方法准确性的标准之一是评估建树方法所能得到真实拓扑结构的概率, 然而该方法需要对真实的系统发育树有一定的了解, 但事实上大部分研究只能通过使用计算机对系统发育关系进行模拟, 对系统发育关系的真实情况反而了解较少, 故此

方面的研究难以深入。在对比各建树方法的优劣时可选用更具有生物学意义的模型，但通常来说各个方法之间的差异会特别小。有模拟研究表明ML法和NJ法建树效果相当甚至前者效果稍胜一筹，与MP法比较的结果为ML法的建树效果比MP法要好。Hasted把*Cytb*基因做为序列模拟数据以进行多种建树方法比较，结果表明MP、ML、NJ法三者建树效果基本一致^[67]。

1.3 立题依据

过往研究中对吉林省对朝口岸地区鼠类的种群情况的检测与报道较少，捕获的样本数量也较少，且各研究调查时间较为久远，为有针对性地预防输入性病媒生物传染病，需及时掌握口岸地区病媒生物的种群构成状况，通过分析边境地区传染病主要宿主的来源、传播、流行和疫源地差异等资料，才能提供有更针对性的综合防控措施。

本研究通过探究吉林省对朝口岸地区的鼠类的种类、密度、分布情况，向吉林省各对朝口岸研制科学合理的病媒生物防制方案提供重要的初步数据，也为构建吉林省对朝口岸地区鼠种鉴定基因数据库提供了原始数据，为因鼠种种群变化所可能存在的输入性风险提供预警。此外还利用DNA条形码技术即对已知鼠种的形态学鉴定结果进行复核，同时也对未知的鼠种进行准确鉴定，判断不同鼠种的鼠群迁移变化情况，为其可能携带入境的新型病原体提供预警。

第2章 材料与方法

2.1 样本来源与采样方法

2.1.1 样本来源

依照国境口岸鼠类监测规程（SNT 1240-2003）^[68]，结合通化、长白、延吉、珲春口岸地区特点取不同生境（根据农田、山林、口岸生活区的地区特点和鼠类生活习性），并记录采样时间和采样地区的经纬度。各口岸在吉林省的地理位置可见图2.1。各个生境的采样地点的经纬度情况如下：

珲春口岸的口岸生活区采样点经纬度为：E130.4693，N42.7807；农田采样点经纬度为：E130.4476，N42.7910；林地采样点经纬度为：E130.4617，N42.7911。通化口岸的口岸生活区采样点经纬度为：E126.2920，N41.1712；农田采样点经纬度为：E126.2858，N41.1716；林地采样点经纬度为：E126.2807，N41.1785。延吉口岸的口岸生活区采样点经纬度为：E129.0146，N42.0990；农田采样点经纬度为：E128.9878，N42.0969；林地采样点经纬度为：E128.9990，N42.1000。长白口岸的口岸生活区采样点经纬度为：E128.1863，N41.4174；农田采样点经纬度为：E128.1581，N41.4121；林地采样点经纬度为：E128.1798，N41.4236。



图2.1 各口岸地区地理位置分布图

Figure 2.1 Geographical distribution of port area

2.1.2 采样时间

2021年6月-11月，每月中旬一次，持续3天，遇到大雨等恶劣天气顺延采样计划。

2.1.3 采样方法

在通化、长白、延吉、珲春各个口岸及其附近 1000 米内，选择口岸生活区、农田、林地三个有代表性的生境采用夹夜法进行监测，即在下午 6:30 放夹，第二天清晨 6:00 收夹。鼠夹为二号铁板夹，诱饵为新鲜油条。各个生境每天共布放 50 夹，夹距 5m，行距 50m，连续布置 3 天以上，各个口岸地区各共布鼠夹 3000 夹次。将捕获的死鼠放入白色可密封的塑料袋里，喷洒乙醚熏杀鼠体外寄生虫后封口。四个口岸地区共捕获鼠样 490 只，全程冷链转运，并于-80℃冰箱中保存。

2.2 仪器与试剂

2.2.1 主要仪器

本研究所用到的仪器如下表2.1。

表2.1 主要实验仪器设备

Table 2.1 Main experimental apparatus and equipment

仪器	厂家	产地
超净工作台	BIOBASE	中国
生物安全柜	Nuair	美国
微量移液器	Thermo	美国
台式冷冻离心机	Thermo	美国
涡旋混合器	Scientific Industries	美国
多样品组织研磨器	上海豫明仪器有限公司	中国
高通量金属浴	BIOER	中国
核酸提取仪	上海之江生物科技股份有限公司	中国
梯度 PCR 扩增仪	Applied Biosystems	美国
电子天平	METTLER TOLEDO	美国
微波炉	格莱士	中国
纯水/超纯水系统	Milli-Q	德国

续表2.1

Continued Table 2.1

仪器	厂家	产地
凝胶成像分析系统	AlphaImager	美国
高压灭菌器	SANYO	日本
电泳仪	Analytik Jena AG	德国

2.2.2 主要试剂

本研究所用到的实验试剂如下表2.2。

表2.2 主要实验试剂

Table 2.2 Main experimental reagents

试剂	厂家	产地
PCR 扩增引物	上海捷瑞生物工程有限公司	中国
DNA Marker	TakAra	日本
琼脂糖	Thermo	美国
Loading Buffer	TakAra	日本
DNAgreen	北京天恩泽基因科技有限公司	中国
核酸提取试剂盒	上海之江生物科技股份有限公司	中国
PCR 扩增引物	上海捷瑞生物工程有限公司	中国

2.3 内容与方法

2.3.1 鼠类形态学鉴定过程

将捕获的死鼠放入白色可密封的布袋里，喷洒乙醚熏杀鼠体外寄生虫后封口。在二级生物安全实验室中辨识并记录形态特征，计量鼠样的头长、耳高、体长、尾长、足长以及体重，按照《中国动物志》中的啮齿目、《中国国境口岸医学媒介鉴定图谱》确定具体的鼠种及其性别。记录各个海关的各个监测点的生境信息、捕获鼠类的种类和数量、回收鼠笼数量、丢失和不明原因击发的鼠笼数量。

2.3.2 鼠类分子生物学鉴定过程

(1) 在生物安全柜中无菌解剖鼠类，其步骤如下：对鼠类的腹部使用酒精棉球擦拭消毒，使用经酒精灯消毒后的剪刀在剑突下腹部正中线剪切皮肤并向胸部延伸剪

切，利用无齿镊剥离鼠胸腹部肌肉，将肝脏组织分离出腹腔并剪取到冻存管中，并在-80℃超低温冰箱中保存，并做好捕获口岸、时间、生境点名称的记录。

(2) 取鼠样的肝脏组织并进行研磨，按照核酸提取试剂盒说明书提取鼠DNA；

(3) 选择BatL5310/R6036R引物对鼠 COI 基因片段进行PCR扩增，并将产物送公司进行双向测序；

(4) 根据测序结果，利用NCBI数据库进行BLAST序列比对，根据序列比对的一致性确定物种。

2.3.3 鼠类的 DNA 提取方法

(1) 取捕获鼠样的肝脏组织，于室温下化冻，化冻后剪取黄豆粒大小肝脏组织分装于标号的EP管中，分装后将原肝脏组织放回原处。

(2) 向新取肝脏组织EP管中加入1大3小共4颗磁珠备用。

(3) 取350ul助沉剂缓冲液于粉管中，离心（转速8000rpm，1min）后备用。

(4) 配助沉剂&蛋白酶K混合液50份，（30+20）份，共2管，每份含7ul助沉剂与41ul蛋白酶K，离心（转速8000rpm，1min）后备用。

(5) 向肝脏组织EP管中加入助沉剂&蛋白酶K混合液1份，并加入400ul裂解液。

(6) 将肝脏组织EP管放入组织研磨仪中，研磨1min后取出备用。

(7) 将肝脏组织EP管放入水浴锅中水浴1小时（56℃），期间每5min震荡混匀1次。

(8) 水浴后取混合液于新的标号EP管中，后使用离心机离心，转速为8000rpm，离心1min后取出备用。

(9) 离心后将肝脏组织消化液转移到96孔核酸提取板（1/7列）中，将96孔板放入全自动核酸提取仪中，放入磁套，运行程序：MVN-V 3.0。

(10) 程序结束后弃磁套，取5/11列核酸提取液到新EP管中，并于-20℃中保存。

2.3.4 基因片段扩增

参考Pagès M^[69]，Robins J H^[70]等人的研究中对鼠类 COI 、 $Cytb$ 基因进行测序所用的引物序列，设计本实验所需的引物片段，详见下表2.3。参考赵志亮^[71]的反应引物、PCR扩增体系与条件，本研究中PCR扩增反应体系为50μL体系，其中Taq酶预混液25μL，DNA模板2μL，上下游引物(100μM)各1μL，ddH₂O 21μL。PCR扩增反应共进行35个循环，各反应条件详见下表2.4。

表 2.3 PCR 反应所用引物的序列

Table 2.3 Sequences of primers used in PCR reactions

扩增片段	引物名称	引物序列(5'-3')	片段大小(Kb)
<i>COI</i>	BatL 5310	CCTACTCRGCCATTTTACCTATG	710bp
	R6036R	ATCTCTGGGTGTCCAAAGAATCA	
<i>Cytb</i>	L7	ACCAATGACATGAAAAATCATCGTT	1143bp
	H15915	TCTCCATTTCTGGTTTACAAGAC	

表 2.4 PCR 扩增反应条件

Table 2.4 PCR amplification reaction conditions

扩增片段	程序	温度	时间
<i>COI</i>	预变性	95°C	5 min
	变性	95°C	45 s
	退火	54°C	1 min
	延伸	72°C	1 min
	总延伸	72°C	10 min
<i>Cytb</i>	预变性	94°C	5 min
	变性	94°C	30 s
	退火	55°C	1 min
	延伸	72°C	1 min
	总延伸	72°C	10 min

2.3.5 序列测定与分析

将扩增产物送至上海生工生物工程有限公司进行双向测序。使用DNASTAR软件包中的SeqMan Pro进行各基因序列的拼接和校正。利用NCBI数据库对序列片段进行BLAST序列比对，并根据对比的同源性高低情况进行物种的分子生物学鉴定。若同源性高达99%及以上，则可以初步认定该基因片段的物种，后续仍需进行进化树构建进行最终确定，若该物种与多个相同物种的目标序列在进化树中归为一个大分支且分支的置信度较高（Bootstrap值>50），则可以最终确定其物种。

2.3.6 鼠群数据分析与鼠类遗传特征分析

(1) 根据捕获地信息和捕获鼠的种类数量,使用R软件统计描述不同口岸、不同生境的鼠密度、种群构成等种群丰富度信息,其中鼠密度计算方法如下:先计算有效夹数,有效夹数=布夹总数-无效夹数,无效夹为不明原因丢失或击发的鼠笼,通过鼠密度计算公式得出各口岸、各生境的鼠密度。鼠密度(捕获百分率)=捕鼠数/有效笼数 $\times 100\%$,鼠类优势种指占捕获地的捕获总数10%以上的鼠种。

(2) 在NCBI数据库中下载与鉴定物种同源性高的序列作为参考序列,针对其进行反向互补序列调换后,利用MEGA 7.0软件对各鼠种的 COI 基因和 $Cytb$ 基因进行多重序列比对,在比对后去除引物片段,并进行基于Kimura 2-parameter模型遗传距离分析,使用基于Kimura 2-parameter模型的NJ法构建进化树、使用基于筛选出AIC值最小的核苷酸替代模型的ML法构建进化树(其中AIC值是指Kullback-Leibler(K-L)距离的估计值,K-L距离定义为一个模型被用于近似地替代另一个模型后的信息的丧失),探索捕获的鼠类之间的遗传学联系。

(3) 在NCBI数据库中下载与鉴定物种同源性高的序列作为参考序列,针对其进行反向互补序列调换后,利用MEGA 7.0软件对残缺鼠类的 COI 基因和 $Cytb$ 基因进行多重序列比对,在比对后去除引物片段,并进行基于Kimura 2-parameter模型遗传距离分析,使用NJ法(基于Kimura 2-parameter模型)、ML法(基于筛选出AIC值最小的核苷酸替代模型)、MP法构建系统发育进化树,探索残缺鼠类与其他捕获样本之间的遗传学联系。

2.3.7 技术路线

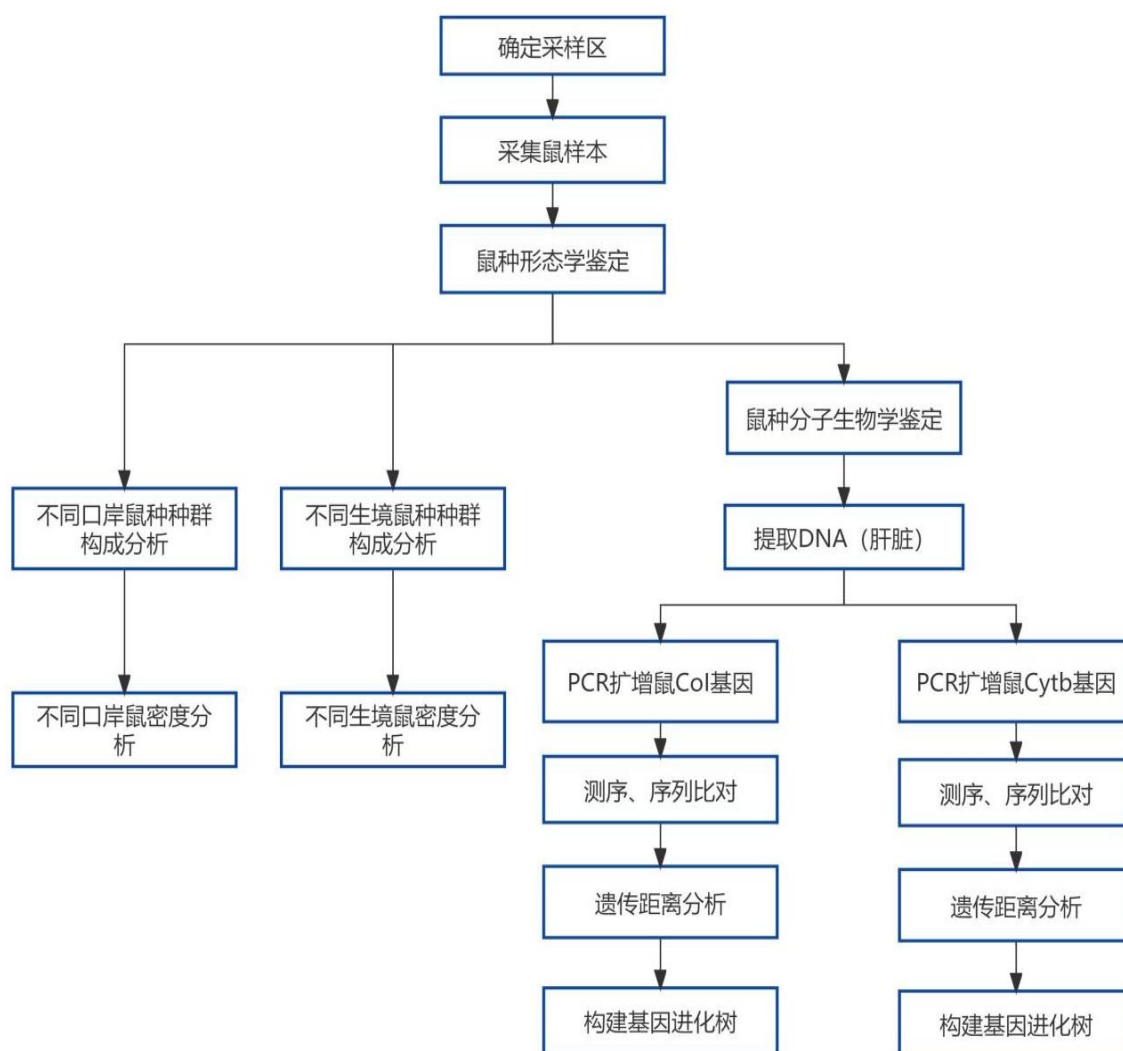


图2.2 技术路线图

Figure 2.2 Technology Roadmap

第3章 结果

3.1 鼠类监测结果

3.1.1 鼠密度

本研究中琿春口岸共布鼠夹 3000 个，有效鼠夹 2786 个，鼠密度为 5.49%；通化口岸共布鼠夹 3000 个，有效鼠夹 2834 个，鼠密度为 3.36%；延吉口岸共布鼠夹 3000 个，有效鼠夹 2798 个，鼠密度为 3.43%；长白口岸共布鼠夹 3000 个，有效鼠夹 2812 个，鼠密度为 5.19%。在 SPSS 22.0 中对吉林省对朝口岸地区的鼠密度进行独立样本的卡方检验，结果表明该地区的鼠密度总体上存在差异($\alpha=0.05, P=0.00001<0.05$)，在卡方检验结果得出有差异的基础上，采用 Bonferroni 方法对允许的一类错误最大概率 α 校正后进行多重比较，事后多重比较的具体结果为琿春、长白口岸地区鼠密度均显著高于延吉、通化口岸地区($P<0.05$)，而琿春和长白口岸地区之间、延吉和通化口岸地区之间的鼠密度则无差异($P>0.05$)。不同口岸捕获鼠类的鼠密度信息详见下表 3.1。利用 SPSS 对吉林省对朝口岸地区的鼠类的性别比例进行独立样本卡方检验，结果为吉林省对朝口岸地区捕获鼠类的性别比例总体上存在差异($\alpha=0.05, P<0.001$)，并在此基础上采用了 Bonferroni 方法，即对 α 进行校正后的多重比较，具体结果为通化口岸地区捕获鼠类之间的性别比例与其他地区相较均存在差异($P<0.05$)，琿春口岸地区与长白口岸地区之间捕获鼠类之间的性别比例存在差异($P<0.05$)，琿春口岸地区与延吉口岸地区、延吉口岸地区与长白口岸地区之间捕获鼠类之间的性别比例均不存在差异($P>0.05$)。捕获鼠类的性别数量信息详见下表 3.1。

表3.1 不同口岸的鼠密度及性别分布情况

Table 3.1 Rodent density and gender distribution at different ports

口岸	有效夹数(个)	捕鼠数(只)				鼠密度(%)
		雌性	雄性	未知性别	合计	
琿春	2786	68	75	10	153	5.49
通化	2834	7	87	1	95	3.35
延吉	2798	39	57	0	96	3.43
长白	2812	37	108	1	146	5.19

本研究中每个生境各共布置鼠夹4000个，其中口岸生活区生境有效鼠夹为3887个，鼠密度为1.08%；农田生境有效鼠夹为2725个，鼠密度为3.81%；林地生境有效鼠夹3618个，鼠密度为8.46%。在SPSS 22.0软件中对吉林省对朝口岸地区不同生境的鼠密度进行独立样本的卡方检验，结果表明不同生境下的鼠密度在总体上存在差异($\alpha=0.05, P=0.00001<0.05$)，在卡方检验结果得出有差异的基础上，采用Bonferroni方法对允许的一类错误最大概率 α 校正后进行多重比较，事后多重比较的具体结果为林地生境的鼠密度高于农田生境的鼠密度($P<0.05$)，农田生境的鼠密度高于口岸生活区生境的鼠密度($P<0.05$)。不同生境捕获鼠类的鼠密度的具体信息见下表3.2。利用SPSS对吉林省对朝口岸地区不同生境的鼠类的性别比例进行独立样本卡方检验，结果表明吉林省对朝口岸地区的不同生境所捕获鼠类的性别比例在总体上存在差异($\alpha=0.05, P<0.001$)，并在此基础上采用了Bonferroni方法进行 α 进行校正后进行多重比较，具体结果为口岸生活区生境捕获鼠类之间的性别比例与农田生境的样本性别比例存在差异($P<0.05$)，林地生境捕获鼠类之间的性别比例与农田生境的样本性别比例存在差异($P<0.05$)，口岸生活区生境捕获鼠类之间的性别比例与林地生境的相应样本不存在差异($P>0.05$)。其余捕获鼠类的性别数量的具体信息详见下表3.2。

表3.2 不同生境的鼠密度及性别分布情况

Table 3.2 Distribution of rodent density and sex in different habitats

生境	有效夹数(个)	捕鼠数(只)				鼠密度(%)
		雌性	雄性	未知性别	合计	
口岸生活区	3887	8	33	1	42	1.08
农田	3725	3	108	3	142	3.81
林地	3618	112	186	8	306	8.46

此外，利用SPSS对不同口岸的不同生境的鼠密度情况进行卡方检验分析，结果为：四口岸的口岸生活区生境的鼠密度不存在差异($P=0.051>0.05$)。四口岸的农田生境的鼠密度存在差异($P=0.01<0.05$)，事后多重比较显示为琿春和延吉口岸地区的农田生境之间、延吉和长白口岸地区的农田生境之间的鼠密度有差异($P<0.05$)。四口岸的林地的鼠密度存在差异($P=0.0002<0.05$)。事后多重比较显示为琿春和通化口岸地区、

长白和通化口岸地区的林地生境之间的鼠密度均有差异($P<0.05$)。其余信息详见下表 3.3。

表3.3 不同口岸的各生境鼠密度情况

Table 3.3 Rodent densities in different habitats at different ports

口岸	生境	有效夹数 (个)	捕获鼠类 (只)	鼠密度 (%)
琿春	口岸生活区	953	15	1.57
	农田	929	46	4.95
	林地	904	92	10.18
通化	口岸生活区	984	11	1.11
	农田	938	33	3.52
	林地	912	51	5.59
延吉	口岸生活区	976	7	0.72
	农田	931	21	2.26
	林地	905	68	7.51
长白	口岸生活区	974	9	0.92
	农田	927	42	4.53
	林地	897	95	10.59

3.1.2 鼠类的种群构成

本研究于通化、长白、延吉、琿春对朝口岸地区捕获鼠类共 490 只,经形态学鉴定,共计 1 目 5 科 8 属 9 种,各鼠类具体种属名录划分可见附录。根据占捕获地的捕获总数 10%以上的鼠种为优势种,本研究中琿春口岸鼠类的优势种主要为黑线姬鼠 (75.82%)、褐家鼠 (16.99%);通化口岸的优势种主要为褐家鼠 (63.16%)、黑线姬鼠 (31.58%);延吉口岸的优势种主要为黑线姬鼠 (53.13%)、大林姬鼠 (23.95%)、大仓鼠 (21.88%);长白口岸的优势种主要为黑线姬鼠 (55.48%)、褐家鼠 (29.45%);此外本研究还有 6 只捕获的鼠类因肢体残缺而无法进行形态学鉴定,需进一步进行分子生物学鉴定以确定物种。各口岸的鼠类种群构成详见下表 3.4。

表3.4 不同口岸鼠类种群构成情况

Table 3.4 Composition of rodent populations at different ports

鼠种	琿春口岸 n (%)	通化口岸 n (%)	延吉口岸 n (%)	长白口岸 n (%)	合计 n (%)
大仓鼠	1 (0.65)	0 (0.00)	21 (21.88)	7 (4.79)	29 (5.92)
大林姬鼠	0 (0.00)	0 (0.00)	23 (23.95)	0 (0.00)	23 (4.69)
褐家鼠	26 (16.99)	60 (63.16)	1 (1.04)	43 (29.45)	130 (26.53)
黑线姬鼠	116 (75.82)	30 (31.58)	51 (53.13)	81 (55.48)	278 (56.73)
花鼠	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	1 (0.69)	1 (0.21)
未知	3 (1.96)	2 (2.10)	0 (0.00)	1 (0.69)	6 (1.26)
小家鼠	7 (4.58)	3 (3.16)	0 (0.00)	3 (2.05)	13 (2.60)
长尾仓鼠	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	1 (0.68)	1 (0.21)
长爪沙鼠	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	1 (0.68)	1 (0.21)
棕背鼯	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	8 (5.49)	8 (1.64)
合计	153 (100.00)	95 (100.00)	96 (100.00)	146 (100.00)	490 (100.00)

3.1.3 鼠类的分布

本研究中吉林省对朝口岸地区各监测点主要分布于通化、长白、延吉、琿春对朝口岸地区中的生活区、农田和林地，其中捕获于口岸生活区的鼠类 42 只，于农田的鼠类 142 只，于林地的鼠类 306 只。本次研究中不同生境下各鼠类的构成情况为：口岸生活区中的鼠类构成主要为褐家鼠（52.38%）与小家鼠（28.57%）；农田中的鼠类构成主要为褐家鼠（59.15%）与黑线姬鼠（34.52%）；林地中的鼠类构成主要为黑线姬鼠（72.88%），各生境的其余鼠类物种构成详见表 3.5。

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/308023041004006040>