

应用微卫星标记分析圈养大熊猫遗传多样性*

王芳^{1,2,3)**} 彭真信^{4)**} 张金国⁴⁾ 田亮^{1,3)} 韩红兵^{1,3)} 曹之晨^{1,3)} 张志和⁵⁾
沈富军⁵⁾ 李德生⁶⁾ 张和民⁶⁾ 张立波^{2)***} 连正兴^{1,3)***}⁽¹⁾ 中国农业大学, 农业生物技术国家重点实验室, 北京 100094; ⁽²⁾ 中国农业大学动物医学院, 北京 100094;⁽³⁾ 中国农业大学动物科技学院, 北京 100094; ⁽⁴⁾ 北京动物园, 北京 100044;⁽⁵⁾ 成都大熊猫繁育研究基地, 成都 610081; ⁽⁶⁾ 中国保护大熊猫研究中心, 汶川 623006)

摘要 以来源于成都大熊猫繁育研究基地和中国保护大熊猫研究中心的 34 只圈养大熊猫(分为 a 群体和 b 群体)和 7 只圈养野生大熊猫(圈养野生群)作为研究对象, 利用 AY161177~AY161218、Ame- μ 5~Ame- μ 70 和 g001~g905 等 30 个微卫星标记对其遗传多样性现状进行分析, 并探讨保持圈养大熊猫遗传多样性的方法。微卫星数据表明, 30 个微卫星标记多态性好($PIC=0.621\sim0.640$), 圈养大熊猫遗传多样性水平(a 群体: $A=5.48$, $H_o=0.475$, $H_e=0.696$; b 群体: $A=5.24$, $H_o=0.453$, $H_e=0.719$; 圈养野生群: $A=3.80$, $H_o=0.514$, $H_e=0.725$)高于 6 个濒危物种($H_o=0.210\sim0.390$, $H_e=0.150\sim0.430$)但低于 3 个非濒危物种($H_o=0.620\sim0.710$), 圈养大熊猫遗传多样性水平都保持在较高水平, 但圈养群遗传多样性水平与圈养野生群相比有所降低。F 统计量及基因流 Nm 分析结果证明, a、b 两群体间遗传分化程度不高($Nm=2.610$, $F_{st}=0.0874$, $F_{it}=0.4116$), 存在个体交换和一定程度的近交, b 群体近交程度高于 a 群体(a 群体 $F_{is}=0.3221$, b 群体 $F_{is}=0.3983$)。因此, 现阶段圈养大熊猫的管理重点是避免近交和遗传多样性丧失, 将圈养大熊猫种群作为同一管理单元, 把纠正大熊猫系谱中的错误、科学选择大熊猫个体进行群体间交流作为关键点, 利用微卫星技术保持和提高大熊猫种群的遗传多样性水平。

关键词 微卫星, 圈养大熊猫, 遗传多样性

学科分类号 Q75

大熊猫 (*Ailuropoda melanoleuca*) 是中国特有的珍贵濒危物种。由于其食性和生殖能力的高度特化、栖息地质量下降和面积减少以及疾病、人类活动等因素的影响, 大熊猫种群数量急剧下降且被分割成多个孤立的小种群。这些小种群随着遗传多样性的丧失, 陷入了适应性、繁殖力和抗病力日益下降的极危状态, 大熊猫种群变得十分脆弱。圈养繁育是大熊猫保护的一项重要策略, 这一策略使大熊猫的数量得到增长。截至2006年3月, 我国圈养大熊猫种群数量已达188只, 圈养大熊猫种群的数量不断增加, 成功解决了大熊猫自我维持的问题^[1]。但是, 圈养繁育使大熊猫数量增长的同时也带来了近交和遗传多样性丧失的风险, 提高了大熊猫的灭绝敏感性。

物种的遗传多样性是其对环境的生存适应和发展进化的前提。一个种群的遗传多样性水平越高, 在外界环境突变、发生灾难时存活下来的可能性就越大。如果物种失去了原来的遗传多样性, 即整个

种群中存留下来的等位基因很少, 或基因频率分布不平衡, 这个种群存活的可能性就越小, 这样的物种即使被保存下来, 其前景也永远令人担忧。因此, 遗传多样性的保护是物种保护的核心问题, 了解物种的遗传多样性与遗传结构, 有助于我们制定有效的保护策略和措施。

微卫星(microsatellite)是指以少数几个核苷酸为单位的多次串联重复的DNA序列, 广泛随机地存在于真核生物基因组中。微卫星标记多为共显性标记, 多态信息含量高, 便于检测, 集中了其他分子标记的优点, 是一种新型的分子遗传标记, 是目

* 大熊猫国际合作资金项目(WXO308)。

** 并列第一作者。*** 通讯联系人。

张立波. Tel/Fax: 010-62733321, E-mail: zlb129@sohu.com

连正兴. Tel: 010-62732681, Fax: 010-62732436

E-mail: lianzhx@cau.edu.cn

收稿日期: 2007-04-01, 接受日期: 2007-05-28

前种群遗传分析领域中最有效的分子标记^[2].

针对大熊猫遗传多样性的研究很多^[3], 但主要集中在野生种群而忽视了圈养种群. 2006年, 艳丽等^[4]使用8个微卫星标记作为分子标记探讨了卧龙大熊猫保护中心圈养大熊猫种群的遗传多样性, 并建议将保护策略的重点放在制定更有效的繁殖计划以避免近交上. 本文选用30个大熊猫微卫星标记对来自成都大熊猫繁育研究基地和中国保护大熊猫研究中心的圈养大熊猫进行遗传多样性研究, 为制定科学的繁育计划、合理调控圈养大熊猫的种群结构提供科学依据, 促进大熊猫“数量与质量的和谐发展”.

1 材料和方法

1.1 试验材料

1.1.1 血样. 21份血样来自成都大熊猫繁育研究基地, 作为a群体; 13份血样来自中国保护大熊猫研究中心, 作为b群体. 剩余7份血样是两个群体中的圈养野生大熊猫血样. 肝素抗凝, -20°C 保存, 备用.

1.1.2 引物. 试验采用微卫星引物30对, 包括AY161177~AY161218等13对引物^[5]、Ame- μ 5~Ame- μ 70等12对引物^[6]和g001~g905等5对引物^[7]. 选用HEX和FAM荧光标记, 在微卫星上游引物5'端进行标记合成荧光引物, 由上海生工生物技术有限公司合成.

1.2 试验方法

1.2.1 DNA提取. 参照《分子克隆实验指南》^[8]中哺乳动物全血DNA的提取方法, 选用酚-氯仿抽提法, 操作过程中避免物理性因素导致DNA降解, 尽量除尽酚-氯仿、乙醇等试剂, 保证DNA模板的质量. 用0.7%琼脂糖凝胶电泳检测提取产物, -20°C 保存备用.

1.2.2 PCR扩增.

采用25 μl PCR反应体系: 10 $\times$ 反应缓冲液 2.5 μl , dNTP (250 $\mu\text{mol/L}$) 2.0 μl , Taq DNA聚合酶 (5.0 U/ μl) 0.5 μl , 上游引物 (25 pmol/L) 1.0 μl , 下游引物 (25 pmol/L) 1.0 μl , DNA模板 (50~100 ng) 1.0 μl , 双蒸水 17.0 μl .

PCR反应程序: 94°C 预变性5 min, 94°C 变性30 s, $52\sim 65^{\circ}\text{C}$ 退火30 s, 72°C 延伸30 s, 重新转到 94°C 变性30 s, 直至 72°C 延伸30 s, 循环35次后, 72°C 延伸7 min.

1.2.3 PCR扩增产物的检测分析. PCR扩增产物经

过1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测后, 根据条带亮度, 使用灭菌的去离子水将其稀释5~10倍, 取1 μl 稀释产物加入等量的上样缓冲液(去离子甲酰胺: Loading Buffer: Genescan-350TM = 80:30:13, 充分混匀, 4°C 贮存备用), 上样前 94°C 变性3.5 min, 取出后立即插置冰上. 变性的PCR产物在ABI377测序仪中电泳2 h, 收集胶图像. 应用软件GENESCANTM3.1进行数据收集、泳道线校正、分子质量内标校正和迁移片段大小测量, 应用软件GenotyperTM2.5进行基因分型.

1.3 数据分析

利用Excel Microsatellite Toolkit (Version 3.1, Park, 2001)、Cervus (Version 2.0, Tristan Marshall, 1998~2001)、DISPAN (1993, Tatsuya Ota and the Pennsylvania State University)、GENEPOP (Version 3.4, Raymond M. & Rousset F, 2003) 和 FSAT (Version 2.9.3.2, Goudet, 2002) 等软件统计各微卫星标记等位基因数目 (number of alleles per locus, A)、等位基因频率 (allele frequency), 基因杂合度 (heterozygosity, H)、多态信息含量 (polymorphism information content, PIC)、 F 统计量 (F -statistics) 等参数.

2 结果与分析

2.1 DNA提取结果

从41份大熊猫冻存血样中成功提取了基因组DNA, 图1是部分血样提取的基因组DNA经0.7%琼脂糖凝胶电泳检测结果.

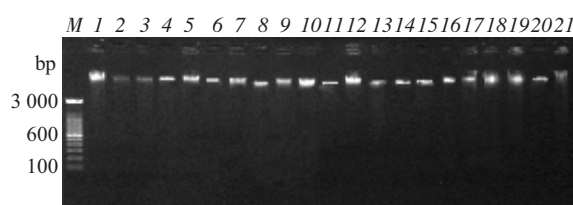


Fig. 1 Electrophoresis map for Giant Panda's genetic DNA
M: 100 bp marker, 1~21: The assign numbers to samples.

2.2 圈养大熊猫群体遗传多样性现状

2.2.1 群体内的遗传变异.

利用AY161177~AY161218^[5]及Ame- μ 5~Ame- μ 70^[6]等25个微卫星标记对a、b两个群体进行遗传多样性研究, 各微卫星标记遗传多样性参数的详细信息见表1.

Table 1 Genetic diversity information for 25 microsatellite markers in 34 captive Giant Pandas										
Markers	A		N		Ho		He		PIC	
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
Ame-μ5	4	3	21	7	0.429	0.429	0.531	0.385	0.442	0.325
Ame-μ11	7	7	20	11	0.650	0.818	0.778	0.823	0.724	0.755
Ame-μ13	4	6	16	12	0.250	0.500	0.647	0.746	0.552	0.672
Ame-μ14	6	4	21	13	0.381	0.769	0.664	0.735	0.616	0.658
Ame-μ16	6	8	21	13	0.476	0.615	0.584	0.775	0.492	0.716
Ame-μ19	5	6	21	13	0.190	0.385	0.727	0.760	0.664	0.694
Ame-μ21	7	5	20	13	0.500	0.154	0.823	0.594	0.775	0.532
Ame-μ23	5	4	18	13	0.222	0.385	0.706	0.729	0.642	0.644
Ame-μ24	8	7	21	12	0.619	0.417	0.851	0.804	0.811	0.741
Ame-μ26	5	6	21	13	0.476	0.462	0.731	0.775	0.665	0.707
Ame-μ 27	7	5	21	13	0.619	0.231	0.780	0.677	0.729	0.614
Ame-μ70	4	4	21	4	0.381	1.000	0.547	0.750	0.489	0.605
AY161177	5	6	12	13	0.333	0.385	0.565	0.809	0.488	0.744
AY161178	7	10	20	13	0.350	0.769	0.603	0.877	0.549	0.826
AY161179	3	3	20	13	0.100	0	0.542	0.591	0.447	0.472
AY161187	5	5	17	12	0.588	0.083	0.702	0.750	0.624	0.675
AY161188	8	7	20	9	0.450	0.333	0.854	0.889	0.811	0.819
AY161192	8	4	19	10	0.632	0.400	0.768	0.689	0.718	0.592
AY161194	5	5	17	11	0.529	0.273	0.692	0.688	0.628	0.608
AY161195	4	5	20	13	0.600	0.846	0.645	0.748	0.557	0.676
AY161198	4	4	21	12	0.476	0.417	0.761	0.678	0.695	0.584
AY161199	6	4	20	11	0.600	0.364	0.795	0.688	0.740	0.593
AY161202	3	4	20	13	0.650	0.538	0.612	0.578	0.530	0.506
AY161214	7	3	19	8	0.684	0.250	0.757	0.675	0.699	0.556
AY161218	4	6	19	12	0.684	0.500	0.740	0.757	0.672	0.685
All	5.48	5.24	19.4	11.5	0.475	0.453	0.696	0.719	0.630	0.640

A: Number of alleles per marker; He and Ho: Expected and observed heterozygosity; PIC: Polymorphism information content; a: a population; b: b population.

a. 等位基因数目(A). a群体中, 微卫星等位基因数目3~8个, 平均等位基因数为5.48; b群体中, 微卫星标记等位基因数目3~10个, 平均等位基因数为5.24.

b. 微卫星标记多态信息含量. 微卫星标记多态信息含量(PIC)是衡量微卫星变异程度高低的一个指标, 反映微卫星多态性的高低. b群体中, 微卫星标记 Ame-μ5 和 AY161179 的 PIC 值分别为 0.325、0.472, 介于 0.25~0.5 之间, 具有中度多态性^[9], 能够提供较合理遗传信息, 其余微卫星标记 PIC 值在 0.504~0.826 之间变动, 25 个微卫星标记在 b 群体中平均多态信息含量为 0.640, PIC>0.5 具有高度的可提供信息性. a 群体中, Ame-μ5、Ame-μ16、Ame-μ70、AY161177 和 AY161179 等 5 个标记 PIC 值介于 0.25~0.5 之间, 其中 Ame-μ5 的

PIC 值最低为 0.442, 具有中度多态性, 其余微卫星标记 PIC 值介于 0.549~0.811 之间, a 群体平均多态信息含量为 0.630, 低于 b 群体.

本研究的 25 个微卫星标记提供了较高的遗传信息, 反映了 a、b 两个圈养大熊猫群体都是遗传多样性较为丰富的群体, 但 a 群体等位基因多样性低于 b 群体, 遗传多样性也相对低于 b 群体.

c. 基因杂合度(H). 基因杂合度又称基因多样性, 一般认为它是度量群体遗传变异的一个最适参数, 各个微卫星座位的杂合度能反映群体内各基因座的遗传变异情况, Jurg^[10]将多态标记定义为杂合度至少为 0.10 的标记. 本研究中, 群体 a 的基因杂合度观察值(Ho)和期望值(He)分别在 0.100~0.684 和 0.531~0.854 的范围内, 群体 b 的基因杂合度的观察值(Ho)和期望值(He) 分别在 0~1.000 和 0.385~

0.889之间变化. 除AY161179外(a群体中 $H_o=0.100$, b群体 $H_o=0$), 25个微卫星标记都表现出了多态性.

物种的遗传多样性常用多个标记的平均杂合度来描述, 标记平均杂合度的大小反映了群体遗传变异程度的高低. 群体平均杂合度高, 表明该群体的遗传变异大, 遗传多样性丰富; 平均杂合度低, 则群体遗传变异小, 遗传多样性匮乏.

a、b群体基因杂合度观察值(H_o)的平均值分别为0.475和0.453, 期望值(H_e)的平均值分别为0.696和0.719, 与埃塞俄比亚狼($H_o=0.21$)、猎豹($H_o=0.39$)、北方毛鼻袋熊($H_o=0.32$)等受威胁种的

杂合度相比^[11], a、b两个圈养大熊猫群体的平均杂合度水平较高, 是遗传多样性较为丰富的群体. a、b两个群体的 H_o 均明显低于 H_e , 特别是b群体, 表明群体中纯合子个体较多, 存在着一定程度的近交现象.

2.2.2 群体间遗传多样性.

a. 群体间的遗传分化. F 统计量是用来测量群体间遗传分化程度的指标, 通过每个标记的固定指数 F_{it} 、 F_{st} 、 F_{is} 检验群体的遗传分化. 两个圈养大熊猫群体各个标记的 F 统计量分析结果见表2.

Table 2 F -statistics analysis of 25 microsatellite markers in two groups of captive Giant Pandas

Markers	a population	b population	a and b populations		
	F_{is}	F_{is}	F_{is}	F_{st}	F_{it}
AY161177	0.421 1	0.534 9	0.490 6	0.108 9	0.546 1
AY161178	0.425 5	0.127 3	0.280 5	0.197 1	0.422 3
AY161179	0.819 5	1.000 0	0.895 0	0.154 3	0.911 2
AY161187	0.166 7	0.893 2	0.483 6	0.099 2	0.534 9
AY161188	0.479 5	0.639 1	0.530 4	-0.013 0	0.524 4
AY161192	0.1818	0.433 1	0.262 9	0.155 2	0.377 2
AY161194	0.240 1	0.615 4	0.388 1	0.102 7	0.451 0
AY161195	0.071 3	-0.138 0	-0.018 0	0.016 6	-0.001 0
AY161198	0.379 8	0.395 6	0.385 5	0.008 8	0.391 0
AY161199	0.250 0	0.483 9	0.3261	0.114 8	0.403 5
AY161202	-0.065 0	0.071 8	-0.013 0	-0.005 0	-0.017 0
AY161214	0.098 3	0.645 6	0.249 5	0.120 5	0.339 9
AY161218	0.076 9	0.349 8	0.183 9	0.092 8	0.259 7
Ame- μ 5	0.196 4	-0.125 0	0.139 7	0.286 8	0.386 4
Ame- μ 11	0.168 4	0.005 5	0.109 1	0.054 4	0.157 6
Ame- μ 13	0.621 5	0.340 0	0.491 4	-0.013 0	0.485 0
Ame- μ 14	0.432 6	-0.048 0	0.239 7	0.105 3	0.319 7
Ame- μ 16	0.188 6	0.213 1	0.198 6	0.048 3	0.237 3
Ame- μ 19	0.742 8	0.504 1	0.649 1	-0.036 0	0.636 4
Ame- μ 21	0.398 7	0.748 7	0.512 2	0.202 3	0.610 9
Ame- μ 23	0.691 6	0.482 8	0.602 6	0.056 8	0.625 2
Ame- μ 24	0.277 8	0.493 1	0.353 6	0.021 8	0.367 6
Ame- μ 26	0.353 8	0.414 6	0.377 7	0.116 7	0.450 3
Ame- μ 27	0.210 9	0.668 2	0.372 3	0.078 4	0.421 5
Ame- μ 70	0.308 9	-0.412 0	0.173 6	0.117 5	0.270 7
All	0.322 1	0.398 3	0.355 2	0.087 4	0.411 6

F_{is} : The mean gene diversity within population; F_{st} : The gene diversity among groups; F_{it} : The total gene diversity.

Wright^[12]利用近交系数来描述居群片段内和居群片段间的遗传多样性分布. 当把a、b两个群体视为整体, 群体内近交系数(F_{is})为0.355 2, 证明群体内存在一定程度的近交. 群体分化系数(F_{st})为0.087 4, 表明群体间存在较低的遗传结构水平. 由于群体间分化和群体内的近交而导致两个群体的总

近交系数(F_{it})为0.411 6. 用群体内近交系数(F_{it})评价a群体和b群体各自群体内的近交情况, 群体a的近交程度($F_{it}=0.322 1$)低于b群体($F_{it}=0.398 3$).

b. 基因流. 基因流是影响群体内部和群体间遗传变异程度的重要因素, 对基因流的分析有助于更好地认识种群遗传结构形成的原因以及以后的发

展趋势，可以为种群的保护提供更加可靠的理论依据。

基因流可从居群间的遗传分化程度来估算^[11]， Nm (N 为有效群体大小， m 为群体间有效迁移率)是衡量基因流的参数， Nm 与 F_{st} 有近似式： $Nm \approx (1/F_{st}-1)/4$ ^[12]。理论上 $Nm < 1$ 时遗传漂变是群体间遗传分化的主要因素， $Nm > 1$ 时基因流对遗传分化起主要作用^[13]。

由群体分化系数(F_{st})为0.087 4可计算得出a、b两个群体之间基因流 Nm 为2.610， $Nm > 1$ 说明群体间基因交流较频繁，防止了由遗传漂变引起的群体间的遗传分化，群体间不会有较大的分化。

2.3 圈养群体中野生个体的遗传多样性

用g001~g905等^[7]5个大熊猫微卫星标记对7只圈养野生大熊猫个体进行遗传多样性研究。在《按最后居住地排列现存活体系谱表》^[14](截至2003年10月4日)中进行查找研究使用的7只圈养野生大熊猫，发现有4只大熊猫的后代仍存活，特别是287号个体哈兰，系谱记录后代数多，可认为是a群体的奠基者。

5个大熊猫微卫星标记遗传多样性参数的详细信息见表3。5个标记共得到22个等位基因，各个标记的等位基因数目(A)为3~5，平均等位基因为3.8。各标记的多态性信息含量(PIC)在0.517~

0.674之间变动，平均为0.617，5个标记均表现出高度多态性。

5个微卫星标记杂合度的期望值(He)为0.725 (0.626~0.780)，高于a、b两个群体，7个圈养野生个体具有较为丰富的遗传多样性。

Table 3 Genetic diversity information for 5 microsatellite markers in 7 captive wild Giant Pandas

Markers	<i>A</i>	<i>Ho</i>	<i>He</i>	<i>PIC</i>
g001	3	0.571	0.626	0.517
g002	4	0.286	0.758	0.655
g008	3	0.429	0.692	0.567
g901	4	0.429	0.780	0.674
g905	5	0.857	0.769	0.671
All	3.8	0.514	0.725	0.617

A: Number of alleles per markers; *He* and *Ho*: Expected and observed heterozygosity; *PCI*: Polymorphism information content.

2.4 人工系谱与聚类对比

根据两个大熊猫个体间每个微卫星标记的等位基因信息构建相似矩阵，利用相似矩阵对a、b两个群体的34个圈养大熊猫个体进行个体聚类，聚类结果见图2。在人工谱系《The 2003 International Studybook for Giant Panda》^[14]可查找到a群体中a1~a7、a9~a17和a19等17只大熊猫个体的谱系记录，根据记录绘制得到系谱图，见图3。

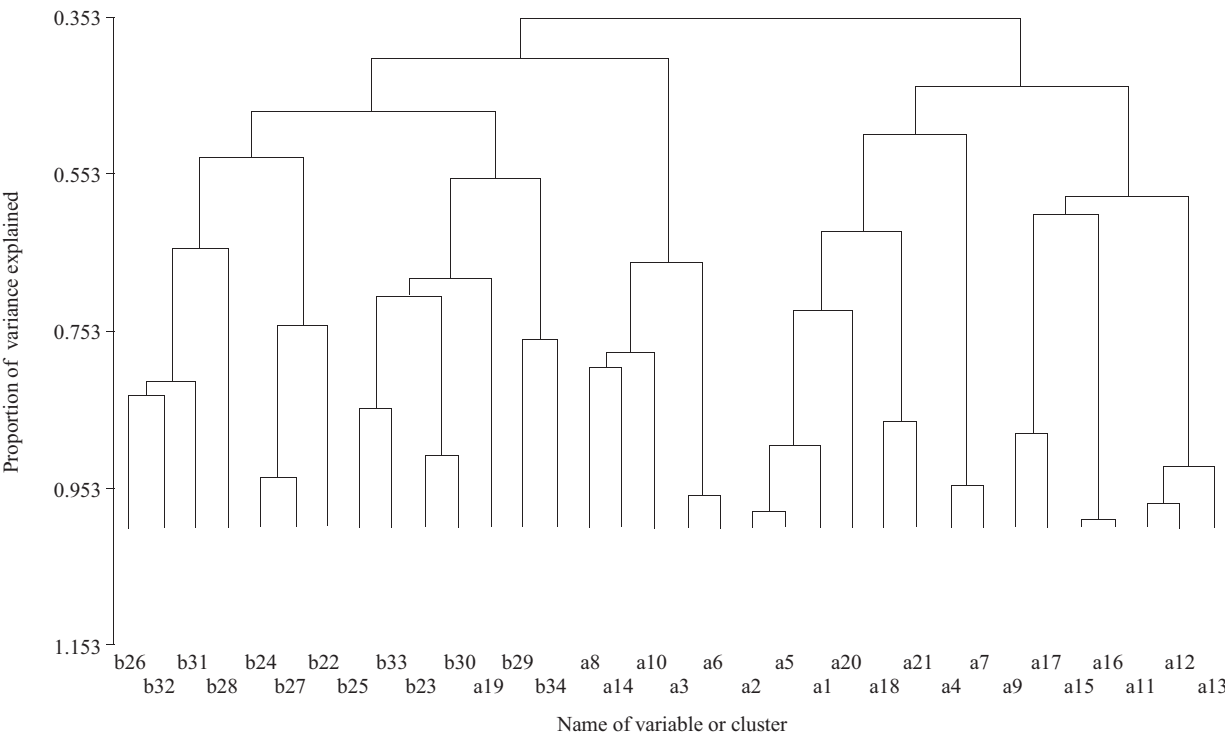


Fig. 2 Cluster map for 34 captive Giant Pandas
a : a population; b: b population.

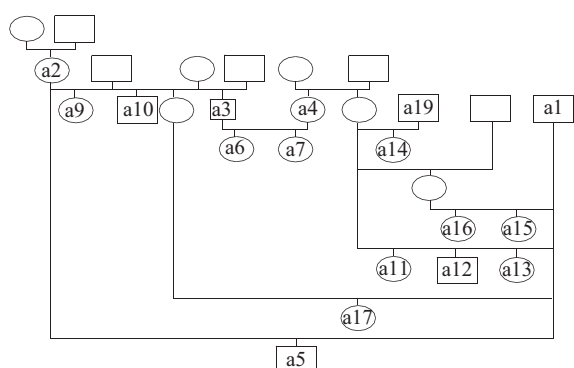


Fig. 3 Pedigree map for 17 captive Giant Pandas

○: Female giant pandas; □: Male giant pandas, a: a population.

聚类结果显示a、b两个群体主要分为两个家系，a群体的a3、a6、a8、a10、a14和a19个体与b群体的个体聚在一个家系。将聚类图和系谱记录显示的大熊猫个体间的亲缘关系进行比较发现，系谱记录中双胞胎a11、a12和a13同父同母，双胞胎a15、a16与a17同父，a1、2a是5a的亲本，与聚类显示的亲缘关系一致，同时，聚类图还显示有半同胞关系的17a与a15、a16之间的同源性低于全同胞a11、a12、a13之间的同源性，也低于有父子关系的a1和a5之间同源性。a3、a4是a6、a7的亲本，而聚类结果显示a3与a6聚为一类，a4与a7聚为一类，并且分别聚在不同的家系中。在系谱记录中a14与a3、a6、a10亲缘关系是较远的，聚类结果将a14与a3、a6、a10聚为一类，而没有和它的父本a19聚为一类，a14与a3、a6、a10、a19之间的关系有待进一步研究。

3 讨 论

3.1 大熊猫微卫星标记

Barker^[15]建议，在研究家畜品种间的遗传时，所用的微卫星数目不应低于25，彼此不连锁，每个标记座位上至少有4个等位基因。本试验使用的AY161177~AY161218^[5]和Ame-μ5~Ame-μ70^[6]等25个微卫星标记在a、b两个圈养群体中，等位基因数目在3~10个之间变化，平均值大于5，多态信息含量PIC大于0.5，符合等位基因多样性高的标准，准确地表达了两个圈养大熊猫群体遗传多样性丰富的信息。

大熊猫微卫星标记AY161177~AY161218由沈富军等^[6]应用磁珠法富集得到，本研究检测到AY161177、AY161178、AY161187、AY161188、

AY161199等5个微卫星标记等位基因数目高于沈富军等检测的结果^[5]，微卫星AY161218在本研究中也得到稳定扩增，检测到丰富的多态性（a群体： $A=4$ ， $PIC=0.684$ ；b群体： $A=6$ ， $PIC=0.500$ ）。

田亮^[16]在17只大熊猫中检测到g001、g008、g901、g905等4个大熊猫微卫星标记PIC值介于0.614~0.688之间，与本研究中g001~g905等^[7]5个大熊猫微卫星标记多态性信息含量PIC值平均为0.617的结果一致，g001、g008、g901、g905等5个标记表现出高度多态性。

AY161177~AY161218^[5]、Ame-μ5~Ame-μ70^[6]和g001~g905等^[7]30个大熊猫微卫星标记多态性好，适合用于大熊猫保护遗传学等方面的研究。

Ame-μ11、Ame-μ24和AY161188分别在两个群体保持着较多的等位基因数目和较高的PIC值，特别是AY161188，在两个群体中PIC值均高于0.8，稳定地保持了高度多态性。Ame-μ11、Ame-μ24和AY161188群体遗传性较为丰富，具有较高的选择潜力，可作为性状与标记间连锁分析的候选遗传标记，用于数量性状标记定位研究。

3.2 圈养大熊猫遗传多样性现状分析

遗传多样性保护是物种保护的核心问题，种群的遗传多样性可通过多种指标来衡量。在微卫星数据的分析中常用两类多样性指标：一是基于等位基因数的等位基因多样性，即各标记的平均等位基因数；二是基于等位基因频率分布的杂合度分析^[17,18]。

本研究对两个群体中有圈养后代的野生个体进行分析研究，这些圈养野生个体5个微卫星标记平均的杂合度期望值(H_e)为0.725，与艳丽等^[4]对邛崃野生种群研究结果 H_e 为0.779相一致，均高于本研究中a、b两个圈养大熊猫群体的杂合度期望值(H_e)的平均值(分别为0.696和0.719)，野生大熊猫表现出丰富的遗传多样性，作为圈养群体的奠基者，野生个体为保持和提高圈养群体遗传多样性的丰富程度做出了积极贡献。

将本研究得到的杂合度信息与文献信息进行比较(表4)，大熊猫的观察杂合度和期望杂合度分别在0.453~0.581和0.620~0.779之间变化，高于濒危物种的杂合度，而低于非濒危物种的杂合度。比较结果表明，作为濒危物种的大熊猫，无论是野生群还是圈养群遗传多样性水平都保持在较高水平，这是多年来采取的移地保护、建立自然保护区、减低生境片段化等措施的成效；而圈养大熊猫的杂合度

比野生大熊猫的杂合度有所降低，究其原因，一方面大熊猫和很多其他濒危物种一样，是在物种处于“最后一口气”时才建立圈养种群的，能获得的奠基者数量很少，导致遗传多样性丧失和高比率的近交；另一方面在封闭的小居群中，个体最终将趋向亲缘化，因此近交是不可避免的^[12]。

对 F 统计量和 N_m 值进行分析，科学数据进一

Table 4 Genetic diversity among populations of 7 species				
	Species	H_e	H_o	Data source
Non-endangered species	<i>Thalarcos</i>		0.62	Pactkac <i>et al.</i> , 1995 ^[11]
	<i>Phascolarctos cinereus</i>		0.81	Houlden <i>et al.</i> , 1996 ^[11]
	<i>Lasiorhinus latifrons</i>		0.71	Frankham, 2001a ^[11]
Endangered species	<i>Lasiorhinus krefftii</i>	0.27		Taylor <i>et al.</i> , 1994 ^[19]
	<i>Panthera leo persica</i>	0.15		Menotti-Raymond <i>et al.</i> , 1995 ^[20]
	<i>Ovis canadensis</i>	0.43		Forbes <i>et al.</i> , 1995 ^[21]
Ailuropoda melanoleuca	Qionglai population	0.779	0.581	YAN Li <i>et al.</i> , 2006 ^[4]
	Captive wild population	0.725	0.514	This study
	Wolong captive population	0.62	0.574	YAN Li <i>et al.</i> , 2006 ^[4]
	a population	0.696	0.475	This study
	b population	0.719	0.453	This study

H_e and H_o : Expected and observed heterozygosity.

步证明本研究中两个大熊猫种群间遗传分化程度不高，没有形成显著的遗传结构，两个种群间可能存在一定程度的迁移和基因流。a、b两个圈养大熊猫群体之间基因流 N_m 为2.610，说明了两群体间个体交换的频繁。值得重视的是，a、b两个圈养大熊猫群体存在一定程度的近交，特别是遗传多样性相对高于a群体的b群体，b群体内近交系数 F_{is} =0.3983，高于a群体(F_{is} =0.3221)，在遗传管理过程中要特别注重避免近交，保护遗传多样性资源。

3.3 圈养大熊猫遗传多样性保持的方法探讨

圈养种群在大熊猫的保护中与野生种群具有同等重要的地位，保护一个圈养种群就是要使之能够从遗传上和种群数量上成为野生种群存活、恢复的后备力量。保护圈养种群，恢复野生种群有两个核心任务：一是保存一个至少安全数量的种群，二是保存这一物种的遗传多样性。截至2006年3月，我国圈养大熊猫种群数量已达188只，其中仅中国保护大熊猫研究中心就达98只，成都大熊猫繁育基地的大熊猫种群数量也达46只。圈养大熊猫种群的数量不断增加成功解决了自我维持的问题^[1]。这也预示着圈养大熊猫的管理进入维持阶段，重心应该转到精细的遗传管理上，避免近交衰变、遗传多样性丧失等，维持群口上的稳定性和阻止有害的遗传变异^[11]。

3.3.1 纠正系谱错误，制定科学合理的繁育计划。

在实际的遗传管理中，记录清楚、准确的系谱

十分重要，是制定科学合理的繁育计划、避免近交衰退和遗传多样性丧失的基础。传统系谱管理使用的是人工系谱，不可避免的存在很多错误，不易发现。利用微卫星标记可以发现并纠正这些错误，保证系谱档案的正确性。

本研究利用微卫星DNA技术得到的数据，绘制了成都大熊猫繁育研究基地、中国保护大熊猫研究中心两个圈养大熊猫群体的个体聚类图，直观清晰地表明了34只大熊猫的遗传关系，分析发现聚类结果与人工系谱纪录存在差异。利用微卫星DNA技术绘制分子系谱即可纠正人工系谱中的错误，还提供了人工系谱中不能显示的遗传信息，为制定合理的繁育计划提供了科学依据。

3.3.2 合理划分管理单元，科学选择交换个体，保持和提高种群的遗传多样性水平。

濒危物种的近交和近交衰变在封闭的小圈育居群中是不可避免的，为了尽量减少这类问题，濒危物种在一个地区的全部圈育居群通常当单个单元来管理^[12]，便于进行动物交换，使近交最小化，提高群体遗传多样性的安全性。

本研究中两个大熊猫种群间遗传分化程度不高，群体间及群体内部存在一定程度的近交，存在一定程度的基因流。Gutierrez-Espeleta等^[22]认为，基因流对于遗传多样性的维持是十分有效的。选择迁入个体实际上是选择迁入的等位基因，迁入外来基因后可改变原有群体的等位基因频率和遗传结

构. 最基本的选择原则就是选择健康的、无关的个体. 针对稀有基因的保存, 可以设计迁入计划, 根据要提高哪些等位基因的频率来限制迁入个体的条件. 本研究中两个大熊猫种群可作为同一保护单元或管理单元, 利用微卫星作为选择迁入个体的有效标记, 保证科学地确定迁入个体使之参与繁殖, 保持和提高种群的遗传多样性.

3.3.3 延长大熊猫的世代时间, 减低遗传多样性的丧失.

圈养种群所代表的遗传多样性水平与种群大小、建群个体数量、世代间隔时间等特性有关, 此外还受选择、突变和遗传漂变的影响. 圈养种群一般是小种群, 遗传漂变的影响是十分显著的, 相比之下, 选择和突变对遗传多样性的影响几乎可忽略. 由于遗传漂变, 遗传多样性在每一世代都要有部分丢失. 因此, 时代间隔时间越长, 世代越少越有利于保存遗传多样性. 因此, 过短的世代间隔会增加遗传多样性丢失的概率. 37个加勒比海火烈鸟200年之内能维持90%的原始遗传性, 因为它们世代时间为26年^[23].

圈育管理的目标是保持物种90%以上的遗传多样性至少100年^[11]. 圈养大熊猫居群一般个体数较少, 平均世代时间是9.187年^[24], 要达到保持90%以上的遗传多样性至少100年的目标具有一定难度. 世代间隔时间取决于大熊猫的生物学特性, 但是在圈养条件下也可以人为地在一定范围内延长或缩短, 因此延长大熊猫的世代时间对维持遗传多样性是一条有效途径.

致谢 衷心感谢北京动物园、成都大熊猫繁育研究基地和中国保护大熊猫研究中心为本试验提供大熊猫血样. 特别感谢浙江大学动物科技学院徐宁迎教授协助制作了大熊猫个体聚类图.

参 考 文 献

- 张泽钧, 张陕宁, 魏文辅, 等. 移地与圈养大熊猫野外放归的探讨. 兽类学报, 2006, **26** (3): 292~299
Zhang Z J, Zhang S N, Wei W F, *et al.* Acta Theriologica Sin, 2006, **26** (3): 292~299
- Balbus F, Lugon Moulin N. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. Molecular Ecology, 2002, **11** (2): 155~161
- Fang S G, Wan Q H, Fujihara N. A new oligonucleotide probe for the giant panda. Molecular Ecology Notes, 2002, **2** (3): 352~355
- 艳丽, 黄炎, 张保卫, 等. 卧龙圈养大熊猫遗传多样性现状及预测. 兽类学报, 2006, **26** (4): 317~324
Yan L, Huang Y, Zhang B W, *et al.* Acta Theriologica Sin, 2006, **26** (4): 317~324
- 沈富军, Watts P, 张志和, 等. Dynal磁珠富集大熊猫微卫星标记. 遗传学报, 2005, **32** (5): 457~462
Shen F J, Watts P, ZHANG Zhi-He, *et al.* Acta Genet Sin, 2005, **32** (5): 457~462
- Zhi L, Johnson W E, Memotti-Raymond M, *et al.* Patterns of genetic diversity in remaining giant panda populations. Conservation Biology, 2001, **15** (6): 1596~1607
- 张亚平, 王文, 宿兵, 等. 大熊猫微卫星DNA的筛选及其应用. 动物学研究, 1995, **16** (4): 301~306
Zhang Y P, Wang W, Su B, *et al.* Zoological Research, 1995, **16** (4): 301~306
- 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南. 第三版. 北京: 科学出版社, 2002. 965~966
Sambrook J, Russell D W. Molecular Cloning: A laboratory Manual. 3rd. Beijing: Science Press, 2002. 965~966
- Botstein D, White R L, Skolnick M, *et al.* A genetic linkage map for cattle. Genetics, 1994, **136** (2): 619~639
- Jurg O. Analysis of Human Genetic Linkage. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 2001. 82
- 法兰克福 R, 巴卢 D J, 布里斯科 DA. 保育遗传学导论. 第三版. 北京: 科学出版社, 2005. 1~487
Frankham R, Ballou D J, Briscoe D A. Introduction to Conservation Genetics. 3rd. Beijing: Science Press, 2005. 1~487
- Wright S. Evolution in mendelian population. Genetics, 1931, **16** (2): 97~159
- Slatkin M. Gene flow and the geographic structure of natural populations. Science, 1987, **236** (4803): 787~792
- Xie Z, Jonathan G. The 2003 International Studybook For Giant Panda (*Ailuropoda melanoleuca*). Beijing, 2003. 1~170
- Barker J S F. A Global protocol for determining genetic distance among domestic livestock breeds. Proceedings of the 5th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Guelph Ontario Canada, 1994, **21**: 501~508
- 田亮. 应用微卫星进行大熊猫亲子鉴定及微卫星在染色体上的物理定位. [学位论文]. 北京: 中国农业大学, 2006
Tian L. Paternity Assignment and Mapping of Microsatellite in Giant Panda. [Degree Paper]. Beijing: China Agricultural University, 2006
- Nei M. Molecular Evolutionary Genetics. New York: Columbia University Press, 1987. 57
- Leberg P L. Estimating allelic richness: effects of sample size and bottlenecks. Molecular Ecology, 2002, **11** (11): 2445~2449
- Taylor A C, Sherwin W B, Wayne R K. Genetic variation of microsatellite loci in a bottlenecked species: the northern hairy-nosed wombat *Lasiorhinus krefftii*. Molecular Ecology, 1994, **3** (4): 277~290
- Menotti-Raymond M A, O'Brien S J. Evolutionary conservation of ten microsatellite loci in four species of Felidae. Journal of Heredity, 1995, **86** (4): 319~322
- Forbes S H, Hogg J T, Buchanan F C, *et al.* Microsatellite evolution in congeneric mammals: domestic and bighorn sheep. Molecular Biological Ecology, 1995, **12** (6): 1106~1113
- Gutierrez-Espeleta G A, Kalinowski S T, *et al.* Genetic variation and population structure in desert bighorn sheep: implications for conservation. Conservation Genetics, 2000, **1** (1): 3~5

- 23 季维智. 动物保护繁殖的理论. 浙江: 浙江科学技术出版社, 1998.15
 Ji W Z. Theory of Animal Conservation Breeding. Zhejiang: Zhejiang Science and Technology Press, 1998.15

- 24 黄炎, 张贵权, 张和民. 圈养大熊猫的繁殖特性和生命表. 四川动物, 2001, **20** (2): 94~96
 Huang Y, Zhang G Q, Zhang H M. Sichuan J Zoology, 2001, **20** (2): 94~96

Studies on Genetic Diversity of Captive Giant Pandas (*Ailuropoda melanoleuca*) Based on Microsatellite DNA Markers*

WANG Fang^{1,2,3**}, PENG Zhen-Xin^{4**}, ZHANG Jin-Guo⁴, TIAN Liang^{1,3},
 HAN Hong-Bing^{1,3}, CAO Zhi-Chen^{1,3}, ZHANG Zhi-He⁵, SHEN Fu-Jun⁵, LI De-Sheng⁶,
 ZHANG He-Min⁶, ZHANG Li-Bo^{2)***}, LIAN Zheng-Xing^{1,3)***}

⁽¹⁾ State Key Laboratories for AgroBiotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094, China;

⁽²⁾ College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100094, China;

⁽³⁾ College of Animal Science and Technology, China Agricultural University, Beijing 100094, China;

⁽⁴⁾ Beijing ZOO, Beijing 100044, China;

⁽⁵⁾ Chengdu Research Base of Giant Panda Breeding, Chengdu 610081, China;

⁽⁶⁾ China Research and Conservation Center for the Giant Panda, Wenchuan 623006, China)

Abstract 34 captive Giant Pandas (captive population: including a population and b population) and 7 captive wild Giant Pandas (captive wild population) are study objects. Their blood samples are got from Chengdu Research Base of Giant Panda Breeding and China Research and Conservation Center for the Giant Panda. 30 microsatellite DNA markers including AY161177~AY161218, Ame- μ 5~Ame- μ 70 and g001~g905 are used to investigate the actual state of genetic diversity within and between samples. Meanwhile, the measures how to maintenance and improve genetic diversity of Giant Pandas are discussed. The information for microsatellite locus showed that 30 microsatellite DNA markers were polymorphic ($PIC=0.621\sim0.640$) and the genetic diversity of 41 captive Giant Pandas was higher (a population: $A=5.48$, $H_o=0.475$, $H_e=0.690$; b population: $A=5.24$, $H_o=0.453$, $H_e=0.719$; captive wild population: $A=3.80$, $H_o=0.514$, $H_e=0.725$) than that of other 6 endangered species ($H_o=0.210\sim0.390$, $H_e=0.150\sim0.430$), but was lower than that of 3 non-endangered species. 41 captive Giant Pandas maintained high genetic diversity. However, compared to 7 captive wild Giant Pandas, the genetic diversity of 34 captive Giant Pandas degraded. The date of F -statistics and gene flow (of 25 microsatellite locus $N_m=2.610$, $F_{st}=0.0874$, $F_{it}=0.4116$) indicated that a population and b population exchanged individuals resulting to inbreeding. There was a low level of genetic variabilities between a population and b population. The inbreeding level of b population was higher than that of a population (a population: $F_{is}=0.3221$, b population: $F_{is}=0.3983$). Therefore, at the present, the focus of management of captive Giant Panda should shift to avoiding the inbreeding and the loss of genetic diversity. The captive populations of Giant Panda should be in the same management unit. Retrieving pedigree and choosing the fittest exchange individual are the key point. Microsatellite technology is the key way to protect and improve genetic diversity of captive Giant Pandas.

Key words microsatellite, captive Giant Panda (*Ailuropoda melanoleuca*), genetic diversity

*This work was supported by National Corporate Finance Program of Giant Panda(WXO308).

**Wang Fang and Peng Zhen-Xin contributed equally to this work.

***Corresponding author.

ZHANG Li-Bo. Tel: 86-10-62733321, Fax: 86-10-62733321, E-mail: zlb129@sohu.com

LIAN Zheng-Xing. Tel: 86-10-62732681, Fax: 86-10-62732436, E-mail: lianzhx@cau.edu.cn

Received: April 1, 2007 Accepted: May 28, 2007