

勐养保护区亚洲象微卫星位点筛选 及种群遗传多样性分析

蔡清秀¹ 林柳¹ 潘文婧¹ 罗述金² 张立^{1*}

(1 教育部生物多样性与生态工程重点实验室, 北京师范大学生态研究所, 北京 100875)

(2 Laboratory of Genomic Diversity, National Cancer Institute, Frederick, MD 21702 - 1201, USA)

摘要: 本文以亚洲象肌肉样品提出的 DNA 为模板, 从非洲象 31 个微卫星位点和 5 个已知亚洲象微卫星位点中筛选勐养亚洲象的微卫星位点, 进而对在西双版纳勐养保护区 3 年采集到的 191 份亚洲象粪便样品中提出的 DNA 进行特异性 PCR 扩增、基因分型、检测位点信息和遗传多样性分析。结果表明: 36 个位点中有 14 个位点能在亚洲象肌肉样品提出的 DNA 中成功扩增, 且经测序证实为微卫星位点。其中 9 个多态位点能在 185 份粪便样品 DNA 中稳定扩增。勐养种群中, 3 个位点可能偏离 Hardy-Weiberg 平衡, 至少 8 个位点间无明显连锁存在, 平均等位基因数 3.78 ± 1.72 , 平均期望杂和度 0.32 ± 0.06 , 平均观察杂和度 0.36 ± 0.02 , 平均多态信息含量 0.28, 说明这 9 个位点适用于勐养亚洲象的遗传学研究。根据微卫星位点的杂合度和等位基因频率, 相比于其他亚洲象种群, 勐养亚洲象种群遗传多样性较低且等位基因频率具有特异性。

关键词: 亚洲象; 近缘种; 微卫星位点; 遗传多样性; 粪便样品

中图分类号: Q786

文献标识码: A

文章编号: 1000 - 1050 (2008) 02 - 0126 - 09

Screening microsatellite DNA markers and genetic variation analysis of wild Asian elephant population in Mengyang Nature Reserve

CAI Qingxiu¹, LIN Liu¹, PAN Wenjing¹, LUO Shujin², ZHANG Li^{1*}

(1 Key Laboratory for Biodiversity Science and Ecological Engineering, Ministry of Education, College of Life Science, Beijing Normal University, Beijing 100875, China)

(2 Laboratory of Genomic Diversity, National Cancer Institute, Frederick, MD 21702 - 1201, USA)

Abstract: To get the appropriate microsatellite markers, we first screened 31 loci originally developed in the African elephant and five in the Asian elephant (*Elephas maximus*) using one muscle sample and then test the locus polymorphism and analyze genetic variation by the total 191 faecal elephant samples collected in Mengyang Nature Reserve through 4 - 8 repeat PCR and genotyping. The results showed 14 loci from the 36 can amplify in the target muscle DNA sample and verified to be microsatellite after sequencing. Nine microsatellite loci were optimized for faecal DNA amplification in the targeted Asian elephant population. For Mengyang population, we obtained amplified product from 185 of the total 191 samples (96.9%) and 55 unique genotypes. 3 loci deviated from Hardy-Weinberg equilibrium and at least 8 loci lacked linkage. The average number of alleles is 3.78 ± 1.72 , the average expected and observed heterozygosity and PIC were 0.32 ± 0.06 , 0.36 ± 0.02 and 0.28, respectively, which indicated that these loci were suitable to genetic researches for Asian elephant. The relatively low heterozygosity (0.32 ± 0.06) and allele frequencies compared with other populations showed that the genetic variation was low and genetic structure was potentially skewed in the Mengyang population.

Key words: Asian elephant (*Elephas maximus*); Faecal sample; Genetic variation; Microsatellite DNA

微卫星 (Microsatellite) DNA 因其分布广泛, 变异度极高和易于检测而被应用于分子生态学、群体遗传学等研究领域 (Gyapay *et al.*, 1994)。利

用近缘物种中已有的微卫星位点扩增新的位点已有很多报道 (Deka *et al.*, 1994; Primmer and Ellegren, 1998; 雷初朝等, 2005; 张琼等, 2005;

基金项目: 美国内政部鱼和野生动物管理局亚洲象保护基金资助项目; 国际爱护动物基金会资助项目

作者简介: 蔡清秀 (1981 -), 硕士研究生, 主要从事分子生态学研究。

收稿日期: 2007 - 07 - 13; 修回日期: 2007 - 12 - 24

* 通讯作者, corresponding author, E-mail: asterzhang@vip.sina.com

赵太云等, 2006), 同时微卫星 DNA 多态片断利用 PCR 扩增获得, 对模板 DNA 的要求相对较低, 所以适合于使用非损伤性 DNA 提取的方法 (张于光等, 2003)。在非损伤性取样中, 粪便样品是最具有潜在价值的研究材料, 不但容易收集, 而且其中所含有的遗传物质能够提供动物分子遗传学的信息 (李明等, 2001; 魏辅文等, 2001)。

亚洲象 (*Elephas maximus*) 是我国一类重点保护野生动物, 被国际自然和自然资源保护联盟 (IUCN) 列为濒危物种 (Santiapillai and Jackson, 1990)。目前仅有 Fernando 等 (2001) 报道的 5 对 (EMX1 - EMX5) 亚洲象的微卫星位点。为了更好地研究中国亚洲象的遗传背景, 本研究从亚洲象的近缘种非洲象 (*Loxodonta africana*) 中筛选微卫星位点, 以获得更多适合中国亚洲象种群的多态性位点, 并以勐养保护区野生亚洲象种群为对象, 采用粪便取样法, 利用筛选的微卫星位点对其种群遗传多样性进行分析。

1 材料和方法

1.1 样品采集

亚洲象粪便样品采集于西双版纳国家级自然保护区的勐养子保护区, 地处中国云南省西双版纳州的北部, 澜沧江河畔, 位于 $100^{\circ}36'45'' \sim 101^{\circ}16'50''E$, $22^{\circ}6'57'' \sim 22^{\circ}23'30''N$, 总面积 997.6 km^2 。主要采样地点如图 1。分别于 2004 年、2005 年和 2006 年在有象群活动地区收集野象排遗 3 d 内的新鲜粪便各 50 份, 82 份, 59 份, 共计 191 份。

为避免交叉污染, 取样时均带一次性无菌薄膜手套, 剥取粪便表层, 每一份样品置于一个采样瓶中, 以 75% 的酒精浸泡保存, 同时记录取样时间、采集地点 GPS 数据等。贴上标签后运回实验室进行 DNA 提取。

本研究所使用的一份肌肉样品来源于 2003 年勐养保护区电击致死的一头成年雌象。肌肉样品作为筛选微卫星位点和阳性对照使用。

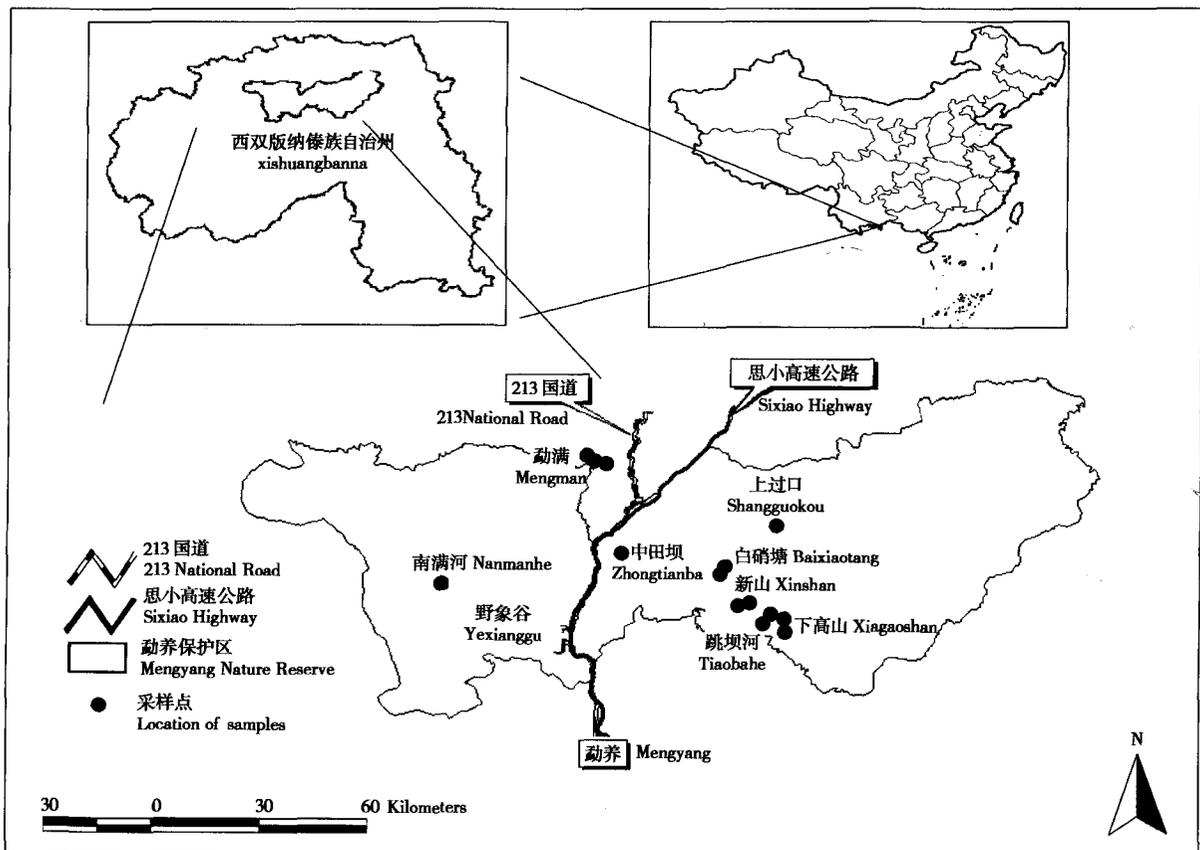


图 1 勐养保护区亚洲象粪便取样点

Fig. 1 The location sites of feces samples in Mengyang Nature Reserve of Asian elephant

1.2 实验方法

1.2.1 DNA 提取

粪便样品中 DNA 的提取参考张保卫等 (2004)、马利超 (2004) 和杨帆 (2006) 的研究。每份粪便样品提取两次。具体步骤为:

1) 富集细胞: 充分振荡存样瓶, 将悬浊液移至 50 ml 离心管中, 静置 8 h。转移上层沉淀细胞到 15 ml 离心管中, 5 000 r/min 离心 5 min, 弃去上清, 自然干燥。

2) 消化: 于沉淀 (~1.2 g) 中加入 3 ml 消化液并 50 μ l 蛋白酶 K (20 mg/ml), 56 $^{\circ}$ C 消化 20 min, 5 000 r/min 离心 5 min。

3) 吸附胆盐: 于体系中加入适量 (~1.5 g) 马铃薯淀粉, 充分混合后 5 000 r/min 离心 5 min。

4) 去除多糖: 转移 2 000 μ l 上清至 15 ml 离心管, 加入 500 μ l NaCl 溶液 (3.5 M), 充分混合。然后加入 70 $^{\circ}$ C 的 CTAB - NaCl 溶液 (10% CTAB/0.7 M NaCl) 280 μ l, 70 $^{\circ}$ C 水浴 10 min, 每隔 2 min 混匀一次。

5) 抽提: 于混合液中加入等体积的酚 - 氯仿 - 异戊醇溶液, 充分混合后转移至 2.0 ml 离心管, 10 000 r/min 离心 10 min, 保留上清。

6) 柱纯化: 于上清中加入等体积的 DNA 吸附剂, 充分混合后, 以 CP3 (Sephacryl S400) 过柱。以 75% 乙醇溶剂过柱, 洗涤两次。

7) 回收: 空柱 10 000 r/min \times 1 min 处理后, 转移到收集管, 超净台内静置 30 min 后, 以 200 μ l TE 过柱, 6 000 r/min \times 1 min 收集洗液。

对于亚洲象肌肉样品 DNA 提取采用传统的酚 - 氯仿有机抽提法。

1.2.2 位点筛选

根据重复单元大于等于 2 和重复次数较多的原则, 通过查阅文献和公共数据库 NCBI 得到 31 个非洲象的微卫星位点信息和引物序列, 具体位点信息见表 1。我们先用一只亚洲象 (勐养自然保护区, 2003 年电击致死) 肌肉样品提出的 DNA 进行试验, 然后把成功扩增的位点对粪便样品中提出的 DNA 进行检测。

表 1 非洲象 31 对微卫星位点信息

Table 1 The information of the 31 microsatellite loci screened original for African elephant

位点 Locus	重复单元 Repeat motif	引物序列 Primer sequence (5' to 3')	序列号 Accession no.
P1 LaT05	(CCAT) ₂ CCAC (CCAT) ₁₄ CAT (CCAT) ₁₇	F: CACCACCCATCCATCTGT R: TGGCTTCTGTGAGTTCACC	AY172173
P2 LaT06	(CCAT) ₁₃	F: AGCCAGGCACATTAAGTGT R: TCTCCTAGAAAAGGTTACCACA	AY172174
P3 LaT07	(ATCT) ₁₉ ... (ATCT) ₁₆ AT (CATC) ₁₅ CATT (CATC) ₄	F: CCTGAGCCATTTTCTTGAG R: GATGGAGAGACAGATTGCTAG	AY172175
P4 LaT08	(TAGA) ₁₆	F: ATGGACAGGCAGAAAAGATT R: TCCCAATAACAGGATAGCATT	AY172176
P5 LaT13	(CATC) ₂₁	F: TGAGCTTCTGTAGGCTCTGA R: GCACTCGATAAACAGTGTGA	AY172177
P6 LaT16	(GGAT) ₃ GGCG (GGAT) ₁₈	F: TGGATGAATGGCAAATGG R: GCACAACACCTGCCTGTCA	AY172178
P7 LaT17	(GGAT) ₁₅ ... (GGAT) ₁₀	F: TTCCTGAGACCTATGCAGGG R: AAAATACCAGCCTGAGTGTGC	AY172179
P8 LaT18	(CCAT) ₂₂	F: AATCCAAGATTGGGCAACAC R: GCTCAGATAACAAAATGAATGG	AY172180
P9 LaT24	(GGAT) ₂₂	F: AAGTTGAGAGATCAGCAAAGCA R: GATGTTCACTCCTTCTTAGCA	AY172182
P10 LaT25	(CCAT) ₁₅	F: TGAGACCGTCTTCATGAGATG R: ATGCAAGCTTACAATGCCAG	AY172183
P11 LaT26	(GGAT) ₃ G (GGAT) ₅ (GGGAT) ₇ GGAT (GGGAT) ₃ CGAT (GGGAT) ₄	F: AACCAGGCTAAAGCACCAA R: TTTCTGCTTGAGACCCAAA	AY172184
P12 LafMS07	(GATA) ₄ (GACA) ₁₃ (GATA) ₃	F: TACCCCACTCCAATCCATGTCT R: GGACAGGCAGAATCTAGTGGAGG	AY817499
P13 LafMS08	(TC) ₈ (AC) ₁₃	F: CTGTGGCCTCCAATGAAGGG R: CAGACACTGGGAGGGAGATG	AY817500

续表 1 Continued from table 1

位点 Locus	重复单元 Repeat motif	引物序列 Primer sequence (5' to 3')	序列号 Accession no.
P14 LafMS09	(GATA) ₂ (GACA) ₇	F: CTGGGGCAGTAAGCTGTATTATC R: ACGAGGATGACAGACCAGGCAACA	AY817501
P15 LafMS10	(CA) ₄ CT (CA) ₆ CT (CA) ₁₁	F: GTCATGGGGGATACACAGTCA R: TCATGTGTGCATGGGGT	AY817502
P16 LafMS11	(CA) ₅ TA (CA) ₁₁	F: TAGGTTTCATAGATCATAGGGT R: TACGTCTGTGATCAGTGGGCCT	AY817503
P17 LafMS06	(AC) ₁₄	FAGCTGTCCTAAGTCATAAATACACA R: ACAGCCACTGAAACCCCATGGA	AY817498
P18 FH48	(CA) ₂₂	F: GAGTCTCCATAATCAAGAGCG R: CCTCCCTGGAATCTGTACAG	A206279
P19 FH60	(CA) ₁₃	F: CAAGAAGCTTTGGGATTGGG R: CCTGCAGCTCAGAACACCTG	A206280
P20 FH71	(CA) ₁₄	F: GGGATTGGCTAAAATAG R: CTAAGCACATCAGGGAC	A206283
P21 FH94	(CA) ₁₆	F: TTCCTCCACAGAGCAGC R: ATGGTTAATTTGCCAGTCCC	A206284
P22 FH102	(CT) ₁₁ (CA) ₁₄	CTTCATTAAGTACCTAAACGAG GGACAGGGCTGGAGAAATATG	A206285
P23 LA2	((CA) ₆ (CGTA)) ₂ (CA) ₆	F: CTGGTGGGAGTCATGACCT R: GGAGAAATGACTGCCCGATA	AF311671
P24 LA3	(CA) ₁₀	F: TACTCTGCTCCTCTGCCTATCC R: GCAGAAATTTTGGTCTTGGAGG	AF311672
P25 LA4	(CA) ₁₂ (CGTA) ₄ (CA) ₇	F: GCTACAGAGGACATTACCAGC R: TTTCTCAGGGATTGGGAG	AF311673
P26 LA6	(CA) ₁₃	F: AAAATTGACCCAACGGCTC R: TCACGTAACCACTGCGCTAC	AF311675
P27 LA5	(CA) ₁₃	F: GGGCAGCCTCCTTGTITTT R: CTGCTTCTTTCATGCCAATG	AF311674
P28 FH103	(CA) ₁₃	F: TGTGCTGCCACTTCCTACAC R: GATGTTGAGACAGTTCTGTAAG	A206286
P29 LafMS03	(TG) ₁₅	F: CATATGAACATACCGGAAC R: GAAACTCCTCGAGTAGTAGAA	AF061842
P30 LafMS02	(AC) ₁₆	F: GAAACCACAACTTGAAGGG R: TCGCTTGTAAGAAGGCGTG	AF061841
P31 LafMS01	(CT) ₁₃ (CA) ₁₆	F: GTCGTCGCCCCAGCACAGTCGCT R: ACCTGATTCAGGGAGCACCG	AF061840

P1-P11 参考 Archie 等, 2003; P12-P17 参考 Nyakaana 等, 2005; P18-P22 和 P28 参考 Comstock 等, 2000; P23-P27 参考 Eggert 等, 2000; P29-P31 参考 Nyakaana 和 Arctander 1998

P1 - P11 come from Archie *et al.*, 2003; P12 - P17 come from Nyakaana *et al.*, 2005; P18 - P22 and P28 come from Comstock *et al.*, 2000; P23 - P27 come from Eggert *et al.*, 2000; P29 - P31 come from Nyakaana and Arctander, 1998.

1.2.3 PCR 扩增、基因分型、遗传多样性分析

利用近缘种中成功筛选出的微卫星位点 (P8, P10, P14, P15, P19, P21, P24, P23, P26) 和 5 对 (EMX1 - EMX5) 亚洲象微卫星位点对所采集的 191 粪便样品提出的 DNA 在 PTC-200 型扩增仪进行 PCR 扩增。每次扩增过程中严格设定阴性对照, 反应总体积为 10 μ l, 具体为: 5 μ l Hotstar Taq mix (Qiagen), BSA (10 μ g/ μ l) 0.5 μ l, 上下游引物各 1 μ l (2.5 pmol/ μ l) (终浓度 0.25 μ M),

模板 DNA 2.5 μ l。位点 M2, M3, M5 扩增 PCR 程序参考 (马利超, 2004), 位点 P19, P21, P23, P24 采用降落式 PCR, 95 $^{\circ}$ C 热启动 15 min 后, 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 首次循环 62 $^{\circ}$ C, 复性 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 1~10 个循环复性温度每次降低 1 $^{\circ}$ C, 10 个循环后复性温度保持在 52 $^{\circ}$ C, 共进行 30 个循环, 最后一个循环结束后 72 $^{\circ}$ C 延伸 15 min。位点 P14 也采用降落式 PCR, 10 个循环从 68 $^{\circ}$ C 降落到 58 $^{\circ}$ C, 10 个循环后复性温度保持在 58 $^{\circ}$ C, 共进行 28 个循

环, 最后一个循环结束后, 72℃ 延伸60 min, 位点 P15, 5个循环从60℃ 降落到55℃, 复性时间为90 s, 5个循环后复性温度保持在55℃, 共进行30个循环, 最后一个循环结束后, 60℃ 延伸30 min。

根据多管法扩增的方法 (Taberlet *et al.*, 1996) 每份粪便样品进行4次重复PCR。不同的引物5'端前分别带上Fam, Hex, Tamara 荧光标记。PCR产物首先经过变性处理后 (94℃, 4 min), 10 μl 变性体系 (9.7 μl 甲酰胺 + 0.3 μl rox500 (内标) + 0.8 μl 三种荧光标记的PCR产物) 在ABI Prism 3100 DNA sequencer (Applied Biosystems) 上进行等位基因大小的检测。等位基因结果在软件 Genemapper package (Version 3.0, Applied Biosystems) 进行分析、阅读。至少在2次重复中都出现2个等位基因判为杂合体。在4次重复中都仅一个等位基因出现判为纯合体。如果不满足这些原则, 再重复4次, 直至结果可判读为止。如果样品中出现多于2个等位基因的情况, 则判为样品被污染, 在后面的分析中删去。

利用 Microsatellite toolkit 获得匹配的基因型。考虑到等位基因丢失 (allele dropout) 和错误判读的存在, 参考其他文献, 在分析中我们把所有位点相同以及一个等位基因不同的样品判为同一个个体 (Bellemain *et al.*, 2005; Solberg *et al.*, 2006; Zhan *et al.*, 2006)。对于所有位点的识别概率 (P_{ID}) (Paetkau and Strobeck, 1994) (种群内随机两个个体在多位点上具有相同基因型的概率) 和

完全同胞识别概率 ($P_{(ID)sib}$) (Waits *et al.*, 2001) (同胞个体基因型完全一样的概率), 用软件 GIMLET 1.3.3 (Valiere, 2002) 进行计算。

$$P_{(ID)} = \sum p_i^4 + \sum \sum (2p_i p_j)^2$$

$$P_{(ID)sib} = 0.25 + (0.5 \sum p_i^2) + [0.5 (\sum p_i^2)^2] - (0.25 \sum p_i^4)$$

其中, P_i 和 P_j 表示第 i 个和第 j 个等位基因的频率。

使用软件 GENEPOP version 3.4 (updated version 1.2, Raymond and Rousset, 1995) 检验各个位点是否符合 Hardy-Weinberg 平衡以及位点间是否存在连锁现象, 同时计算各个位点的等位基因频率、杂合度和信息含量等参数以及种群的遗传参数。

2 结果

2.1 筛选位点

所使用的31对引物中有9对 (29.03%) (P8, P10, P14, P15, P19, P21, P23, P24, P26) 能够成功在亚洲象肌肉提出的DNA样品中扩增。经回收后测序确认都为微卫星位点。这9对位点中有6对 (66.67%) 能够在粪便中提出的DNA样品中成功扩增 (P14, P15, P19, P21, P23, P24)。已知的5个 (M1 - M5) 亚洲象微卫星位点都能在肌肉中提出的DNA样品中扩增, 其中仅3个能在粪便中提出的DNA样品中成功扩增。具体信息见表2。

表2 勐养保护区亚洲象种群中成功扩增的位点信息

Table 2 The information of locus amplified successfully in Mengyang Asian elephant (*Elephas maximus*) population

位点 Locus	原名 Origin name	片断长度 Allele size	发表的重复单元 Repeat units published	实际测序后得到的重复单元 Real repeat units sequenced	肌肉样品扩增 Muscle samples	粪便样品扩增 Dung samples
M2	EMX-1	131-143	(GTT) ₁₄		+	+
M3	EMX-2	215-221	(GTT) ₅		+	+
M5	EMX-5	236-260	(GGAA) ₃ ... (GGAAGGGA) ₄ ..	(GGAA) ₃ .. (AGGG) ₃	+	+
M1	EMX-3	238-254	(GGAA) ₃ .. (GAA) ₅ .. (GGAA) ₄		+	-
M4	EMX-4	351-387	(GGAA) ₃ A (GA) ₃ A (GGAA) ₃		+	-
P14	LafMS09	145-149	(GATA) ₂ (GACA) ₇	(CTCT) ₆ (CTAT) ₂	+	+
P19	FH60	148-156	(CA) ₁₃	(GT) ₁₃	+	+
P21	FH94	212-226	(CA) ₁₆	(CA) ₁₀	+	+
P24	LA3	178-182	(CA) ₁₀	(CA) ₈ ... (CA) ₆	+	+
P15	LafMS10	125-129	(CA) ₄ CT (CA) ₆ CT (CA) ₁₁	(CA) ₁₉	+	+
P23	LA2	233-249	((CA) ₆ (CGTA)) ₂ (CA) ₆	(GT) ₆ AC (GT) ₇ AC (GT) ₇	+	+
P10	LaT25	338-342	(CCAT) ₁₅	(CCAT) ₂₄	+	-
P8	LaT18	500左右	(CCAT) ₂₂	((CCAT) ₃ GCAT) ₆	+	-
P26	LA6	150左右	(CA) ₁₃	(CA) ₁₁	+	-

表中“+”表示可以扩增,“-”表示无法扩增;“+” mean successful amplification,“-” mean fail amplification)

2.2 基因分型

191 份粪便样品中有 185 份样品能够在 9 个位点成功扩增 (96.9%)。如果容忍 1 个位点 1 个等位基因的不同 (主要为 2 个碱基重复的位点), 185 份样品得到 55 个基因型。

2.3 遗传多样性

9 个位点在勐养保护区亚洲象粪便样品中扩增后所得的具体信息见表 3, 各个位点等位基因的频率见表 4。

表 3 勐养保护区亚洲象种群九个位点的遗传信息

Table 3 The genetic information of each loci used in Mengyang Nature Reserve

位点 Locus	基因型 数量 N	等位基因数 A	片断长度 Observed allele size range (bp)	期望杂和度 H_e	观察杂和度 H_o	多态信息 含量 PIC	随机识别 概率 $P_{(ID)}/Locus$	同胞识别概率 $P_{(ID)sib}/locus$
m2	55	3	131 - 143	0.17	0.18	0.16	6.94E-01	8.43E-01
m3	55	2	215 - 221	0.04	0.04	0.04	9.27E-01	9.65E-01
m5	55	6	236 - 260	0.49	0.40	0.45	2.78E-01	5.77E-01
P14	55	2	145 - 149	0.49	0.85	0.37	3.73E-01	5.98E-01
P19	55	3	148 - 156	0.54	0.84	0.46	2.87E-01	5.52E-01
P21	55	6	212 - 226	0.40	0.42	0.37	3.67E-01	6.48E-01
P24	55	3	178 - 182	0.29	0.20	0.25	5.29E-01	7.41E-01
P15	55	3	125 - 129	0.12	0.02	0.12	7.66E-01	8.83E-01
P23	55	6	233 - 249	0.31	0.25	0.30	4.73E-01	7.19E-01
均值 Average value	55	3.78 ± 1.72		0.32 ± 0.06	0.36 ± 0.02	0.28		

表 4 勐养保护区 9 个微卫星位点等位基因频率

Table 4 The allele frequency of each loci at the Mengyang Nature Reserve

位点 Locus	等位基因 Alleles	等位基因频率 (%) Allele frequency (%)
M2	131	90.91
	134	0.91
	143	8.18
M3	215	1.82
	221	98.18
M5	236	2.73
	240	68.18
	244	4.55
	248	4.55
	252	0.91
	260	19.09
P14	145	44.55
	149	55.45
P19	148	36.36
	150	56.36
	156	7.27
P21	212	6.36
	214	76.36
	218	0.91
	220	11.82
	222	3.64
	226	0.91
P24	178	0.91
	180	16.36
	182	82.73
P15	125	2.73
	127	93.64
	129	3.64
P23	233	0.91
	241	5.45
	243	3.64
	245	6.36
	247	82.73
	249	0.91

经 Hardy-Weinberg 平衡检验, 除了 P14, P19 和 P15 这 3 个位点偏离了 Hardy-Weinberg 平衡 ($P < 0.001$), 其他 6 个位点未偏离 Hardy-Weinberg 平衡。经连锁不平衡检验, 计算了 9 个位点两两配对的基因型不平衡值 (genotypic disequilibrium value) 除位点 P14 与 P21 的 $P = 0.00423$, 其余 $P > 0.01$, 其中 M3 与 P21 的 $P = 0.01084$, 其余都为 $P > 0.05$, 其中 P14 与 M3 的 $P = 0.27061$, 表明 P14 与 P21 两个位点间可能存在一定程度的连锁。

根据位点识别概率由低到高的排列次序, 对于勐养保护区 9 个位点总的 3 种识别概率分别为: $P_{(ID)}(\text{unbiased}) = 1.349e - 03$, $P_{(ID)}(\text{biased}) = 1.734e - 03$ 和 $P_{(ID)}(\text{sibs}) = 4.720e - 02$ 。

3 讨论

由于重复序列和包含引物位点的侧翼序列在物种间具有保守性, 一个物种的微卫星引物可以用来检测近缘种同源位点的多态性。本研究所选的 31 对非洲象微卫星位点在亚洲象肌肉样品中有 9 对能成功扩增, 也证实了这一点, 但同时根据测序发现, 所得位点的序列和重复单元可能与原物种中的不一致 (表 2), 这可能是不同物种间的差异所引起的。因此, 微卫星引物在近缘物种间扩增到产物, 并不一定意味着成功, 还需要通过测序来确定所扩增出的条带是否是实验所期望的产物。

研究中所选用的位点在粪便样品中扩增时, 5个位点扩增失败 (M1, M4, P10, P8, P26), 其中 M1 在粪便样品中不能扩增。M4, P10, P8 因为目的片断较长, 在粪便样品中扩增不稳定。正如 Buchan 等 (2005) 指出等位基因的长度与扩增成功率呈现明显的负相关, 对于粪便样品宜选用片断长度较短的位点, 一般300 bp以下较为适合。

本研究通过4~8次重复 PCR, 匹配修正后获得55个独立的基因型。一般认为重复的次数越多, 结果越可靠, 误判率越低。但是实验所消费的人力财力也相应增多, 因此选择适合的重复次数显得十分重要。本研究的几次重复过程中, 1次重复正确率仅为85%左右, 2次重复增加为90%左右, 3次重复达到98%, 4次重复正确率可达到99.37% (除去位点 M5)。位点 M5 在某些重复中未能得到有效扩增, 所以很多样品重复 PCR 的次数达8次。所以对于非损伤性样品的基因分型建议至少进行3次重复 PCR, 对于基因频率较低的等位基因一般4次较为适合, 如果还出现不能扩增的情况 (如本研究中的 M5) 就要重复8次甚至更多, 使得有效读数次数达到3次以上, 正确判断等位基因, 尽量降低错误等位基因的产生。

Waits (2001) 指出利用基因分型对于种群遗传的研究, 要求识别概率 $P_{(ID)}$ 低于或等于0.01。本研究所采用的9个位点, 无偏随机识别概率 $P_{(ID)unbias} = 1.349 \times 10^{-3} < 0.01$, 完全同胞概率 $P_{(ID)sib} = 4.720 \times 10^{-2} < 0.5$, 满足种群遗传多样性研究的基本要求。本研究使用9个多态位点, 连锁分析结果显示至少8个多态位点间无明显连锁, 说明它们在亚洲象基因组中分布较均匀, 世代传递过程中相互独立, 其遗传学特征和多样性水平能较好地代表该物种基因组水平的遗传现状。经 Hardy-Weinberg 平衡检验得知: 除了 P14, P19, P15 三个位点偏离 Hardy-Weinberg 平衡外, 其余位点都未偏离, 可能原因在于: (1) Hardy-Weinberg 平衡适用于随机交配的大种群, 不适于小种群; (2) 存在无效等位基因 (null allele) 的现象; (3) P19,

P15 两个位点是两个碱基重复的单元, 因为结巴带 (stutter) 影响可能存在错误的基因判读。

平均杂和度 (H_e) 是度量种群遗传变异程度的一个最适参数, 多态信息含量 (PIC) 是衡量基因片断多态性的较好指标。一般认为, 在某一群体中当 $PIC > 0.5$ 时该位点表现为高度多态; 当 $0.25 < PIC < 0.5$ 时该位点表现为中度多态; 而当 $PIC < 0.25$ 时该位点表现为低度多态 (牛荣等, 2001)。本研究所使用的9个微卫星位点所获得的数据来看, 勐养亚洲象种群平均等位基因数为 3.78 ± 1.72 , 平均期望杂和度和观察杂和度都很低 ($H_e = 0.32 \pm 0.06$; $H_o = 0.36 \pm 0.02$), 多态信息含量 (PIC) 平均为0.28, 也处于较低的水平。但由于目前没有亚洲象的类似研究报道, 所以无法进行比较。但其中 M2, M3, M5 三个位点在其他研究中有过报道, Fernando 等 (2001) 建库筛选了5对亚洲象微卫星位点, 用20头斯里兰卡亚洲象样本对位点的多态性进行了评估; Fernando 等 (2003) 用线粒体 DNA D-loop 区以及 EMX-1, EMX-2, EMX-3, EMX-4, LafMS03 五个微卫星位点对婆罗洲 (Borneo) 的亚洲象同其他地方的亚洲象进行了比较 (包括柬埔寨、不丹、孟加拉国、泰国、苏门答腊、马来西亚、老挝, 斯里兰卡和印度南部等9个国家); Vidya 和 Fernando (2005) 用6对微卫星 (EMX-1, EMX-2, EMX-3, EMX-4, LafMS02, LafMS03) 对印度南部 Nilgiri 种群遗传结构和社群结构进行了研究。利用 EMX-1, EMX-2 以及 EMX-5 获得的实验数据将勐养种群与其他种群比较, 发现勐养亚洲象种群遗传多样性较低 (见表5~7)。

从表5和表6的数据来看, 勐养亚洲象种群遗传多样性较低, 这与杨帆 (2006) 用线粒体 DNA D-loop 区所得研究结果相一致。其原因可能在于勐养亚洲象是由几群亲缘关系较近的象群所组成, 由于栖息地破碎化等因素, 这些象群已经成为孤立的小种群。因此, 野生动物保护部门应该尽快考虑如何建立生态走廊带使本种群与其他种群自由扩散。

表5 亚洲象勐养种群和斯里兰卡种群杂合度比较

Table 5 Comparison of H_e and H_o of Sri Lanka and Mengyang population

位点 Locus	斯里兰卡 Sri Lanka (N = 20)		勐养 Mengyang (N = 55)	
	H_e	H_o	H_e	H_o
EMX-1 M2	0.47	0.50	0.17	0.18
EMX-2 M3	0.49	0.35	0.04	0.04
EMX-5 M5	0.41	0.20	0.49	0.40

表 6 勐养种群、婆罗洲种群及其他 9 个地方种群位点 M2 和 M3 信息的比较

Table 6 Comparison of loci M2 and M3 information between Mengyang population, Borneo population and other 9 populations

位点 Locus	婆罗洲等位 基因数 Number of Alleles in Borneo	勐养等位 基因数 Number of alleles in Mengyang	9 个种群平均等位 基因数 Average number of alleles in other populations	观察杂合度 (H_o)		
				婆罗洲 Borneo	勐养 Mengyang	其他种群平均值 Other population averaged
M2 EMX - 1	2	3	3.22	0	0.180	0.403
M3 EMX - 2	2	2	2	0	0.040	0.397

表 7 位点 M2, M3 的等位基因频率在 3 个种群中的比较

Table 7 Comparison on the allele frequency of M2 and M3 among three populations

位点 Locus	印度南部 Nilgrili 亚洲象种群 (N=140) Nilgrili elephant population in southern India		云南南滚河亚洲象种群 (N=21) Nangunhe population in Yunnan		勐养亚洲象种群 (N=55) Mengyang population	
	等位基因 Allele	频率 Frequency	等位基因 Allele	频率 Frequency	等位基因 Allele	频率 Frequency
M2 EMX - 1	135	0.56	134 (135)	0.7153	131 (135)	0.9091
	-	-	-	-	134 (138)	0.0091
	147	0.004	144 (147)	0.0723	143 (147)	0.0818
	150	0.436	148 (150)	0.2125	-	-
M3 EMX - 2	219	0.437	219	0.0693	215 (219)	0.0182
	225	0.563	225	0.5369	221 (225)	0.9818
	-	-	221	0.3937	-	-

同印度南部种群和云南南滚河种群相比, 勐养种群在等位基因的频率上存在很大的差异 (表 7) 位点 M2, 在印度南部种群和南滚河种群有 3 个等位基因 135, 147, 150, 在勐养种群中没有等位基因 150, 而出现等位基因 138, 位点 M3, 等位基因 225 在勐养种群中的基因频率达到 98%, 显著高于另外两个种群 (t -test, $P = 0.041$)。这说明了勐养亚洲象种群遗传的特异性。

中国的亚洲象除了勐养种群外, 还有勐腊、尚勇、思茅和南滚河种群, 使用微卫星标记对其他种群遗传多样性的研究, 同时结合本研究进一步对中国亚洲象整体遗传结构的分析是未来的研究方向。如何对 LafMS02, LafMS03, 以及 EMX - 3 (M1) 3 个位点扩增条件进一步的优化, 使其在粪便样品 DNA 中能扩增, 也将是今后研究的重点之一。

致谢: 研究工作得到国际爱护动物基金会西双版纳亚洲象保护项目办公室罗爱东、谢文柯杏、曹大藩、李珍华的大力支持和帮助以及当地护林员的帮助, 野外采样过程中得到冯利民、袁志强、朱文庆、国艳丽、张龙田、陈德坤、李华、黄维妮等的帮助; 实验过程中得到杨帆、刘雨邑的指导, 杜红伟的探讨和建议, 周玉、游丹的帮助; 数据分析写作过程中得到了中国科学院动物研究所李明研究员的指导和帮助, 刘志瑾博士和华东师范大学郁华同学的帮助, 特此一并致谢。

参考文献:

- Archie E A, Moss C J, Alberts S C. 2003. Characterization of tetranucleotide microsatellite loci in the African Savannah elephant (*Loxodonta africana africana*). *Molecular Ecology Notes*, **3**: 244 - 246.
- Bellemain E, Swenson J E, Tallmon D A, Brunberg S, Taberlet P. 2005. Estimating population size of elusive animals using DNA from hunter-collected feces: comparing four methods for brown bears. *Conservation Biology*, **19** (1), 150 - 161.
- Buchan J C, Archie E A, Van Horn R C, Moss C J, Alberts S C. 2005. Locus effects and sources of error in noninvasive genotyping. *Molecular Ecology Notes*, **5** (3): 680 - 683.
- Comstock K E, Wasser S K, Ostrander E A. 2000. Polymorphic microsatellite DNA loci identified in the African elephant (*Loxodonta africana*). *Molecular Ecology*, **9**: 1004 - 1005.
- Eggert L S, Ramkrishnan U, Mundy N I, Woodruff D S. 2000. Polymorphic microsatellite DNA markers in the African elephant (*Loxodonta africana*) and their use in Asian elephant (*Elephas maximus*). *Molecular Ecology Notes*, **9**: 2223 - 2224.
- Fernando P, Vidya T N C, Payne J, Stuewe M, Davison G, Alfred R J, Andau P, Bosi E, Kilbourn A, Melnick D J. 2003. DNA analysis indicates that Asian elephants are native to Borneo and are therefore a high priority for conservation. *Plos Biology*, **1** (1): 110 - 115.
- Fernando P J, Vidya T N C, Melnick D J. 2001. Isolation and characterization of tri- and tetranucleotide microsatellite loci in the Asian elephant, *Elephas maximus*. *Molecular Ecology Notes*, **1** (4): 232 - 233.
- Gyapay G, Morissette J, Vignal A, Dib C, Fizames C, Millasseam P, Mare S, Bernardi G, Lathrop M, Weissenbach J. 1994. The 1993

- 1994 Genethon human linkage map. *Nature Genetics*, **7**: 246 - 339.
- Lei C C, Fan G L, Zhang Y D, Qiu R B, Chen H. 2005. Genetic polymorphism in a cultured population of the crested ibis *Nipponia nippon*. *Acta Zoologica Sinica*, **51** (4): 650 - 656. (in Chinese)
- Li M, W F W, Rao G, Fang S G, Feng Z J. 2001. Application of noninvasive sampling in conservation genetics. *Acta Zoologica Sinica*, **47** (3): 338 - 342. (in Chinese)
- Niu R, Shang H T, Wei H, Huang Z B, Zeng Y Z. 2001. Genetic Analysis of 35 microsatellite loci in 5 lineages of Xishuangbanna Miniature pig inbred line. *Acta Genetica Sinica*, **28** (6): 518 - 526. (in Chinese)
- Nyakaana S, Arcander P. 1998. Isolation and characterization of microsatellite loci in the African elephant, *Loxodonta africana*. *Molecular Ecology*, **7**: 1436 - 1437.
- Nyakaana S, Okello J B, Muwanika V, Siegmund H R. 2005. Six new polymorphic microsatellite loci isolated and characterized from the African Savannah elephant genome. *Molecular Ecology Notes*, **5**: 223 - 225.
- Paetkau D, Strobeck C. 1994. Microsatellite analysis of genetic variation in black bear populations. *Molecular Ecology*, **3**: 489 - 495.
- Raymond M, Rousset F. 1995. Genepop (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Heredity*, **86**: 248 - 249.
- Santiapillai C, Jackson P. 1990. The Asian elephant an action plan for its conservation. Gland, Switzerland: IUCN/SSC Asian Elephant Specialist Group, 1 - 80.
- Solberg K H, Bellemain E, Drageset O M, Taberlet P, Swenson J E. 2006. An evaluation of field and non-invasive genetic methods to estimate brown bear (*Ursus arctos*) population size. *Biological Conservation*, **128** (2): 158 - 168.
- Taberlet P, Griffin S, Goossens B, Questiau S, Manceau V, Escaravage N, Waits L P, Bouvet J. 1996. Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. *Nucleic Acids Research*, **24**: 3189 - 3194.
- Vidya Fernando. 2005. Population differentiation within and among Asian elephant (*Elephas maximus*) populations in southern India. *Heredity*, **94**: 71 - 80.
- Valiere N. 2002. GIMLET; a computer program for analyzing genetic individual identification data. *Molecular Ecology Notes*, **2** (3): 377 - 379.
- Waits L P, Luikart G, Taberlet P. 2001. Estimating the probability of identity among genotypes in natural populations: cautions and guidelines. *Molecular Ecology*, **10** (1): 249 - 256.
- Wei F W, Rao G, Li M, Fang S G, Feng Z J. 2001. Molecular scatology and its application - reliability, limitation and prospect. *Acta Theriologica Sinica*, **21** (2): 143 - 151. (in Chinese)
- Yang F. 2006. Phylogeography and Population Genetic Structure of the Asian Elephant of China. Beijing: Beijing Normal University. (in Chinese)
- Zhang B W, Wei F W, Li M, Lu X P. 2004. A simple protocol for DNA extraction from faeces of the giant panda and lesser panda. *Acta Zoologica Sinica*, **50** (3): 452 - 458. (in Chinese)
- Zhang Q, Ji Y J, Zeng Z G, Song Y L, Zhang D X. 2005. Polymorphic microsatellite DNA markers for the vulnerable Hainan eld's deer *Cervus eldi hainanus* in China. *Acta Zoologica Sinica*, **51** (3): 530 - 534. (in Chinese)
- Zhan X J, Li M, Zhang Z J, Goossens B, Chen Y P, Wang H J, Bruford M W, Wei F W. 2006. Molecular censusing doubles giant panda population estimate in a key nature reserve. *Current Biology*, **16** (12): R451 - R452.
- Zhang Y G, Li D Q, Rao L Q, Xiao Q M, Liu D. 2003. Identification of Polymorphic microsatellite DNA loci and paternity testing of Amur tigers. *Acta Zoologica Sinica*, **49** (1): 118 - 123. (in Chinese)
- Zhao T Y, Lu J, Wang J, Meng X, Chen Z W. 2006. Amplification of microsatellite DNA loci of rats and mice in the Mongolian gerbil. *Chinese Journal of Comparative Medicine*, **16** (2): 114 - 118. (in Chinese)
- 马利超. 2004. 用保护遗传学方法研究亚洲象社群的结构. 北京师范大学硕士学位论文.
- 牛荣, 商海涛, 魏泓, 黄中波, 曾养志. 2001. 版纳小耳猪近交系 5 家系 35 个微卫星座位的遗传分析. *遗传学报*, **28** (6): 518 - 526.
- 李明, 魏辅文, 饶刚, 方盛国, 冯祚建. 2001. 非损伤性取样在保护遗传学研究中的应用. *动物学报*, **47** (3): 338 - 342.
- 张于光, 李迪强, 饶力群, 肖启明, 刘丹. 2003. 东北虎微卫星 DNA 遗传标记的筛选及在亲子鉴定中的应用. *动物学报*, **49** (1): 118 - 123.
- 张保卫, 魏辅文, 李明, 吕晓平. 2004. 大熊猫和小熊猫 DNA 提取的简易方法. *动物学报*, **50** (3): 452 - 458.
- 张琼, 吉亚杰, 曾志高, 宋延龄, 张德兴. 2005. 用于海南坡鹿遗传多样性研究的多态性微卫星 DNA 标记. *动物学报*, **51** (3): 530 - 534.
- 杨帆. 2006. 中国亚洲象分子系统地理学及种群结构研究. 北京师范大学硕士学位论文.
- 赵太云, 路静, 王钜, 孟霞, 陈振文. 2006. 大、小鼠微卫星引物对长爪沙鼠的扩增. *中国比较医学杂志*, **16** (2): 114 - 118.
- 雷初朝, 范光丽, 张永德, 邱荣斌, 陈宏. 2005. 一个人工朱鹮种群的遗传多态性. *动物学报*, **51** (4): 650 - 656.
- 魏辅文, 饶刚, 李明, 方盛国, 冯祚建. 2001. 分子粪便学及其应用——可靠性、局限性和展望. *兽类学报*, **21** (2): 143 - 151.