

SSR Polymorphism of *Alligator sinensis* and Conservation Strategy of Genetic Diversity

HUANG Lei^{1,2}, WANG Yi-Quan^{1, ①}

(1. School of Life Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China;

2. College of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

Abstract: Chinese alligator, *Alligator sinensis*, is a critically endangered endemic species under legislative protection. Results of recent investigations revealed that the number of the alligator was continuously declining in the past 50 years and less than 150 individuals were surviving in the wild until 2000. In order to prevent the extinguishing of this species, the Reproductive Research Center of *Alligator sinensis* and the National Nature Reserve of *Alligator sinensis* were set up in early 1980s in Xuanzhou, Anhui Province. After 20 years of breeding efforts, the number of captive individuals has been brought up to more than 10,000 in total. In order to reveal the genetic structure of Chinese alligator population, total of 39 individuals including 7 wild individuals outside of the research center were sampled to construct wild, F₁ and F₂ groups according to their generations, and 10 microsatellite loci selected from 25 primer pairs originally designed for *Alligator mississippiensis* were employed for investigating the genetic diversity of *Alligator sinensis*. The results indicated that, contrasting with *Alligator mississippiensis* and some other endangered species, Chinese alligator had an extremely low genetic diversity level with $A = 2.38$, $N_e = 1.60$, $H_o = 0.374$, $H_e = 0.350$ and $PIC = 0.327$. There were no significant differences of A , N_e , H_o , H_e , PIC and each SSR locus alleles frequency distribution among 3 groups. However, Hardy Weinberg equilibrium analysis revealed that F₂ captive group showed a remarkable genetic disequilibrium at loci *Ami* 146 and *Ami* 222. The reason accounting for the current genetic status of Chinese alligator is dramatically shrink of the population in past decades. Due to the lack of significant difference between wild group and captive group, all survived Chinese alligator should be treated as one ESU in the next conservation practice. More attention regarding the effective population size and low frequency alleles should be emphasized in genetic management of captive alligators and establishing new separate propagation.

Key words: *Alligator sinensis*; microsatellite DNA; genetic diversity; conservation strategy

扬子鳄种群的微卫星 DNA 多态及其遗传多样性保护对策分析

黄磊^{1,2}, 王义权^{1, ①}

(1. 厦门大学生命科学学院, 厦门 361005; 2. 南京师范大学生命科学学院, 南京 210097)

摘要: 扬子鳄 (*Alligator sinensis*) 是中国特有的珍稀保护动物, 为保护这一濒危物种, 我国于 80 年代初在安徽宣州先后建立了扬子鳄繁殖研究中心和国家级扬子鳄自然保护区, 现饲养种群存鳄数量已达 10 000 余头。为了揭示扬子鳄种群的遗传结构, 共采集了 39 个个体的样品, 其中包括 6 件剥制标本, 按代系不同, 分为野生群、F₁ 代饲养群及 F₂ 代饲养群, 用微卫星 DNA 分子标记对其进行研究。分析结果显示: 扬子鳄种群在微卫星水平表现出很低的遗传多样性, 平均等位基因数 $A = 2.38$, 平均有效等位基因数 $N_e = 1.60$, 平均观察杂合度 $H_o = 0.374$, 平均期望杂合度 $H_e = 0.350$, 平均多态信息含量 $PIC = 0.327$, 3 个群体间 A 、 N_e 、 H_o 、 H_e 、 PIC 及各微卫星位点等位基因频率分布无显著差异, 但 F₂ 代饲养群在 *Ami* 146 和 *Ami* 222 两个位点表现出极显著的遗传不平衡。扬子鳄种群遗传多样性水平低下的主要原因是近几十年来种群数量大幅减少造成, 现阶段应将全部现存的扬子鳄作为一个整体加以保护,

收稿日期: 2003-06-16; 修回日期: 2003-09-30

基金项目: 教育部骨干教师资助计划项目(编号: GG 180 21002403 1740) 和教育部留学回国人员启动基金资助[Supported by Foundation for Univ.

Key Teacher from State Education Ministry(No. GG 180 21002403 1740) and SRF for ROCS, SEM.]

作者简介: 黄磊(1978-), 硕士研究生, 研究方向: 动物分子遗传

① 通讯作者。E-mail: wangyqj@jlonline.com

在建立新的繁殖群体时,应考虑保存物种遗传多样性所必需的有效种群大小,在种群的遗传管理上应注重低频等位基因的和保持。

关键词: 扬子鳄; 微卫星 DNA; 遗传多样性; 保护对策

中图分类号: Q953 文献标识码: A 文章编号: 0379-4172(2004)02-0143-08

扬子鳄(*Alligator sinensis*)是中国特有的珍稀动物,我国政府早在上个世纪70年代就开始对这一极度濒危的物种采取了一系列保护措施。1978年和1981年在安徽省宣州先后建立了扬子鳄繁殖研究中心和国家级扬子鳄自然保护区,80年代人工繁殖成功,使扬子鳄饲养种群的数量逐年增加,由保护区初建时从野外捕获并饲养成活的76条野生扬子鳄作为种鳄,现已繁殖至F₂代,达一万余头。但野外调查结果显示,野外生存的扬子鳄已由上世纪80年代初的约500头降至目前的不足150头^[1~3]。为较全面的了解扬子鳄遗传资源现状,给扬子鳄保护提供必要的理论依据,我们曾用RAPD、AFLP和mtDNA序列分析等分子标记手段对扬子鳄饲养种群的遗传多样性进行了研究,这些研究结果均从不同的侧面反映了扬子鳄种群非常低的遗传多样性,敲响了扬子鳄遗传资源保护现状的警钟,提示有必要进一步揭示其种群的遗传结构特征,以便制订切实有效的遗传多样性保护策略^[4~6]。

微卫星DNA(Microsatellite DNA)又称简单序列重复(Simple Sequence Repeats, SSR),广泛分布于真核生物的核基因组中,由于它具有多态性高、共显性遗传、遍布整个基因组、选择中性、可PCR扩增、易于检测、重复性好等优点,被认为是研究种群遗传变异最为理想的分子标记^[7,8],已用于多种动植物的遗传图谱构建、QTL定位、亲子鉴定、群体遗传结构分析等方面的研究^[9],在濒危动物种群及保护遗传学研究中也得到越来越多的应用。如: Houlden等^[10]

在对一个可能灭绝的澳洲树袋熊(*Phascolarctos cinereus*)种群研究时发现,该种群在微卫星水平的遗传多样性降低;Rooney等^[11]用微卫星标记研究经历过瓶颈效应的弓头鲸(*Balaena mysticetus*)种群发现,虽然历史上其种群数量曾锐减93%,但这并未对其遗传多样性造成显著影响。本研究以安徽宣州扬子鳄饲养种群以及非饲养种群的数头野生鳄为研究对象,应用微卫星DNA分子标记对该物种种群进行研究,为扬子鳄种群的遗传结构特征、种群历史及遗传资源的保护提供相关信息和依据。

1 材料和方法

1.1 样品采集与DNA提取

扬子鳄样品有新鲜血液和馆藏剥制标本的末端趾骨骼两种(表1)。血液样品采用非损伤性取样法,用医用一次性注射器从尾静脉抽取少量血样,加入1/7体积0.5 mol/L EDTA抗凝,置冰盒中带回实验室, - 80℃保存。血液样品中,两个取自安徽扬子鳄繁殖研究中心80年代初建立时捕自野外的亲代鳄,1个取自南京红山动物园70年代购自农民手中的扬子鳄。6个剥制标本的骨骼样品取自南京师范大学动物标本馆70年代以前制作的标本,取样时做到不损伤标本的外形。本研究中把这9件样品作为野生鳄群处理,其余30件血液样品均为安徽扬子鳄繁殖研究中心繁殖的子代,在此分别作为F₁和F₂代饲养群处理。

表1 扬子鳄样品来源数量及类型

Table 1 Sources, numbers and types of Chinese alligator sampled in this study

群体 Group	来源 Source	个体数 No.	样品类型 Type
扬子鳄野生群 Wild group	南京师范大学动物标本馆 Animal Specimen Museum of Nanjing Normal University	6	骨骼 Bones
	南京红山动物园 Nanjing Hongshan Zoo	1	血液 Blood
	安徽扬子鳄繁殖研究中心 Reproductive Research Center of <i>Alligator sinensis</i> in Anhui	2	血液 Blood
F ₁ 代饲养群 F ₁ captive group	安徽扬子鳄繁殖研究中心 Reproductive Research Center of <i>Alligator sinensis</i> in Anhui	11	血液 Blood
F ₂ 代饲养群 F ₂ captive group	安徽扬子鳄繁殖研究中心 Reproductive Research Center of <i>Alligator sinensis</i> in Anhui	19	血液 Blood

血液样 DNA 的提取参照王义权等^[6]的方法。骨骼样品用蒸馏水适当清洗,紫外灯下照射 15 min,捣碎,加适量 0.5 mol/L EDTA 55 °C 浸泡,脱钙过夜,离心,弃上清,重复 2~3 次至沉淀物软化,沉淀物加 DNA 提取缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, 25 mmol/L EDTA, 100 mmol/L NaCl, 0.1 mg/ml 蛋白酶 K) 55 °C 消化至透明状,酚/氯仿抽提,酒精沉淀 DNA,加适量 ddH₂O 溶解,-20 °C 保存备用。

1.2 微卫星引物筛选及扩增

微卫星引物为美国南卡罗来那大学 Travis C. Glenn 博士惠赠,这些引物是依据密西西比鳄(*Alligator mississippiensis*)微卫星位点的两翼序列而设计。本研究先以少数扬子鳄 DNA 样品为模板,用全部 25 对微卫星引物进行 PCR 扩增筛选(至少重复两次),琼脂糖凝胶电泳,EB 染色,紫外检测。有 22 对引物在上述扩增中得到了产物,其中 16 对引物的扩增产物较为特异,从中选出扩增稳定且条带清晰的 10 对微卫星引物,用于本研究中群体样品的微卫星 DNA

多态性分析(表 2)。PCR 反应体积为 15 μ l,包括 10 \times buffer 1.5 μ l、Mg²⁺ (25 mmol/L) 1 μ l、dNTPs(各 2 mmol/L) 1 μ l、上下游引物(10 μ mol/L)各 0.5 μ l、模板 DNA 1 μ l、*Taq* DNA 聚合酶(Promega) 1 U,加适量 ddH₂O。扩增反应均在 PTC-200 型 PCR 仪(MJ Research Inc)上完成,按以下参数进行:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 40 s,复性 40 s,72 °C 延伸 40 s,共 30 个循环;72 °C 补齐 2 min,各组反应的复性温度见表 2。变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分析在 BIO-RAD 测序电泳槽上进行,电泳后用 SILVER SEQUENCETM Stairing Reagents(Promega)银染并读取数据;每个微卫星位点根据扩增产物条带数为 1 或 2 判断为纯合子或杂合子,无扩增条带的则视为无效等位基因(0 基因),据此确定个体的基因型。每一位点扩增片段的长度根据 DNA 分子量标记 Φ X174-*Hae* III digest 电泳迁移率制作的标准曲线估算。部分微卫星位点重复单元的 DNA 测序检验用 CEQ 8 000 遗传分析仪(BECKMAN COULTER)及 CEQTM DTCS 荧光标记测序试剂盒完成。

表 2 微卫星引物及其在扬子鳄样品中的扩增
Table 2 SSR primers and PCR amplification in Chinese alligator

引物对 Primer pair	扩增片段 PCR fragment	片段长度 Fragment length(bp)	重复单元 Repeat unit	复性温度 Annealing temperature(°C)
<i>Ami</i> - μ -2 (a, b)	1	183	AG* *	55
<i>Ami</i> - μ -3 (a, b)	1	297	AC* *	55
<i>Ami</i> - μ -6 (a, b)	1	92	AC*	55
	2	96		
<i>Ami</i> - μ -8 (a, b)	1	146	AC*	55
	2	168		
	3	178		
<i>Ami</i> - μ -15 (a, b)	1	145	TA*	55
	2	147		
<i>Ami</i> - μ -16 (a, b)	1	335	TA* *	55
	2	343		
<i>Ami</i> - μ -18 (a, b)	1	171	AC*	58
	2	183		
	3	209		
<i>Ami</i> - μ -212 (a, b)	1	131	ACTC+ AC*	57
	2	141		
<i>Ami</i> - μ -222 (a, b)	1	122	AG*	55
	2	124		
	3	130		
<i>Ami</i> - μ -224 (a, b)	1	128	AT*	59
	2	160		
	3	164		
	4	178		

注: a, b 表示每一位点的上、下游引物; * : 密西西比鳄中相应位点的重复单元; * * : 已经测序证实了的扬子鳄微卫星 DNA 重复单元。

Note: a and b indicate forward and reversed primers respectively; * : Repeat unit in American alligator; * * : Verified repeat unit in Chinese alligator by se

1.3 数据分析

统计扬子鳄野生群及 F_1 代、 F_2 代饲养种群在 10 个微卫星位点上的等位基因组成、频率及其分布, 对多态位点进行连锁分析, 计算各群体的平均等位基因数 (A)、平均有效等位基因数 (N_e)、平均观察杂合度 (H_o)、平均期望杂合度 (H_e)。参照 Smith 等^[12] 报道的方法计算每个微卫星座位的多态信息含量 (polymorphism information content, PIC), 公式如下:

$$PIC = 1 - \sum f_i^2$$

式中 f_i 表示第 i 个等位基因的频率。根据无偏期望杂合度 (unbiased expected heterozygosity), 分别用无限等位基因模型 (infinite alleles model, IAM) 与渐突变模型 (stepwise mutation model, SMM), 计算各群体的有效种群大小^[13,14], 公式如下:

$$SMM: N_{\mu} = \{ [1/(1-H)]^2 - 1 \} / (8\mu)$$

$$IAM: N_{\mu} = H / [4\mu(1-H)]$$

式中 N_{μ} 表示有效种群大小, H 表示无偏期望杂合度, μ 表示突变率, 对扬子鳄种群遗传结构及特征进行分析。通过杂合度过度 (heterozygosity excess) 及等位基因多样性分析^[15-17], 估测扬子鳄种群是否经历影响其遗传多样性的瓶颈效应。依据各位点的基因型频率对 3 个种群进行哈迪-温伯格遗传平衡 (Hardy-Weinberg genetic equilibrium) 分析。数据分析主要借助软件 POPGENE Version 1.31 (<http://www.uahbert.ca/~fyeh/index.htm>)、GENEPOP Version 3.2a^[18] 及 BOTTLENECK^[15] 完成。

2 结果

2.1 连锁分析

用上述微卫星引物检测了 39 个扬子鳄个体的 10 个微卫星位点, 其中两个位点 $Ami-12$ 、 $Ami-13$ 在全个体中表现为单态, 其余 8 对引物的扩增产物均呈一定程度的多态。计算扬子鳄种群内 8 个多态位点两两配对的基因型不平衡值 (genotypic disequilibrium value), 除位点 $Ami-16$ 与 $Ami-224$ 的 $P = 0.0135$ 外, 其余都为 $P > 0.05$, 表明仅 $Ami-16$ 与 $Ami-224$ 两个位点间可能存在一定程度的连锁。

2.2 遗传多样性

扬子鳄种群在检测到的 8 个多态位点中, 每一

位点可得到 2~4 个等位基因, 平均每一位点 2.38 个等位基因, 有效等位基因 1.60 个。为进一步考查源于密西西比鳄的微卫星引物, 在扩增的扬子鳄 DNA 片段中是否真正含有微卫星 DNA 序列, 特别是 2 个单态性位点。我们对部分位点的扩增产物进一步测序分析。结果表明, 两个单态位点 $Ami-12$ 、 $Ami-13$ 分别含有 $(AG)_n$ 和 $(AC)_n$ 的微卫星 DNA 序列, 多态位点 $Ami-16$ 主要含有 $(TA)_n$, 其中位点 $Ami-13$ 与密西西比鳄中相应位点具有相同的重复单位, 而 $Ami-12$ 、 $Ami-16$ 两个位点的微卫星 DNA 并不同于密西西比鳄中相应位点的 $(AC)_n$ (表 2)。

反映扬子鳄遗传多样性的 A 、 N_e 、 H_o 、 H_e 和 PIC 值的计算结果见表 3。5 种参数在 3 个群体间虽有一定差异, 但均未达到统计显著水平。3 个群体及扬子鳄种群平均的 H_o 均大于相应 H_e 。各多态位点的等位基因在扬子鳄种群中的分布结果见表 4。从表 4 可以看出, 有 5 个等位基因不为 3 个群体所共有, $Ami-18-1$ 只见于野生群和 F_1 代饲养群中, $Ami-15-2$ 仅在 F_1 代饲养群中观察到, $Ami-222-3$ 只见于野生群和 F_2 代饲养群中, 而 $Ami-224-2/4$ 只见于 F_1 和 F_2 代饲养群中, 在可观察到这 5 个等位基因的群体中, 其频率均较低。各位点的等位基因频率分布在 3 个群体间亦无明显差异。参考密西西比鳄微卫星 DNA 的突变率 $\mu = 1.7 \times 10^{-3}$ ^[19], 根据各多态位点数据, 基于 SMM 和 IAM 估测的野生群体、 F_1 和 F_2 饲养群平均有效种群大小分别为 90, 72; 95, 76; 118, 90。

表 3 扬子鳄的遗传多样性

Table 3 Genetic diversity of Chinese alligator

位点或群体	Locus/Group	A	N_e	H_o	H_e	PIC
	$Ami-16$	2	1.80	0.667	0.450	0.444
	$Ami-18$	3	2.01	0.462	0.510	0.504
	$Ami-15$	2	1.05	0.051	0.050	0.050
	$Ami-16$	2	1.17	0.154	0.142	0.142
	$Ami-18$	3	2.05	0.513	0.520	0.513
	$Ami-212$	2	1.60	0.447	0.380	0.375
	$Ami-222$	3	1.86	0.615	0.468	0.462
	$Ami-224$	4	1.55	0.184	0.354	0.353
野生群	Wild group	2.25	1.57	0.342	0.330	0.311
F_1 代饲养群	F_1 captive group	2.50	1.52	0.352	0.340	0.299
F_2 代饲养群	F_2 captive group	2.38	1.71	0.428	0.380	0.370
平均*	Average*	2.38	1.60	0.374	0.350	0.327

*: 各参数 3 个群体的平均值。

*: The average of each parameter for 3 groups.

表 4 扬子鳄种群微卫星等位基因的频率分布
Table 4 SSR allele frequency distribution of Chinese alligator population

位点和等位基因 Locus Allele	<i>Ami-1-6</i>		<i>Ami-1-8</i>			<i>Ami-1-15</i>		<i>Ami-1-16</i>		<i>Ami-1-18</i>			<i>Ami-1-212</i>			<i>Ami-1-222</i>					
	1	2	1	2	3	1	2	1	2	1	2	3	1	2	3	1	2	3	4		
野生群 Wild group	0.222	0.778	0.056	0.556	0.389	1.000		0.944	0.056	0.056	0.333	0.611	0.750	0.250	0.667	0.222	0.111	0.063	0.938		
F ₁ 代饲养群 F ₁ captive group	0.273	0.727	0.046	0.318	0.636	0.909	0.091	0.864	0.136	0.455	0.273	0.682	0.818	0.182	0.864	0.136		0.046	0.046	0.818	0.091
F ₂ 代饲养群 F ₂ captive group	0.421	0.579		0.342	0.658	1.000		0.947	0.053	0.158	0.211	0.632	0.711	0.289	0.605	0.290	0.105	0.026	0.026	0.711	0.237
平均值 Average	0.333	0.667	0.026	0.385	0.590	0.974	0.026	0.923	0.077	0.108	0.256	0.641	0.750	0.250	0.692	0.231	0.077	0.040	0.026	0.790	0.145

2.3 瓶颈效应

在对各群体进行瓶颈效应分析时我们同时选取了IAM、SMM 以及综合二者的TPM(10% IAM+ 90% SMM) 3 种模型, 用符号秩检验(Wilcoxon signrank test) 检测, 检测结果见表 5。结果表明, 3 个群体都表现出杂合度过度。

表 5 瓶颈效应估测的符号秩检测

Table 5 Wilcoxon signrank test of bottleneck estimate in Chinese alligator population

群 体 Group	P value (one tail for H _e excess)		
	IAM	SMM	TPM
野生群 Wild group	0.766	0.988	0.973
F ₁ 代饲养群 F ₁ captive group	0.973	0.994	0.994
F ₂ 代饲养群 F ₂ captive group	0.234	0.469	0.469

2.4 哈迪-温伯格平衡

用基于马可夫链模型(Markov chain method) 的哈迪-温伯格精确 P 值的无偏估测对各群体进行的多位点检测(multilocus test) 发现, 扬子鳄野生群、F₁ 及 F₂ 代饲养群都处于遗传平衡状态; 但对各位点进行的多群体检测(multigroup test) 发现, 扬子鳄种群在 *Ami-1-6* ($P = 0.001$) 与 *Ami-1-222* ($P = 0.001$) 两个位点表现出极显著的不平衡; 进而对 3 个群体中各位点的基因型频率分别做的平衡分析中, 基于杂合子过度(heterozygote excess) 的全数调查(complete enumeration) 分析表明, 仅 F₂ 代饲养群在 *Ami-1-6* ($P = 0.003$) 和 *Ami-1-222* ($P = 0.008$) 两个位点的等位基因表现出极显著的不平衡, 其余位点都处于平衡状态(表 6)。

表 6 扬子鳄种群遗传平衡分析

Table 6 Genotypic equilibrium analysis of Chinese alligator population

群 体 Group	位 点 Loci								多位点 Multilocus
	<i>Ami-1-6</i>	<i>Ami-1-8</i>	<i>Ami-1-15</i>	<i>Ami-1-16</i>	<i>Ami-1-18</i>	<i>Ami-1-212</i>	<i>Ami-1-222</i>	<i>Ami-1-224</i>	
野生群 Wild group	0.659	0.652	*	*	0.968	0.615	0.290	*	0.338
F ₁ 代饲养群 F ₁ captive group	0.396	0.941	0.952	0.857	0.396	0.722	0.857	0.947	0.248
F ₂ 代饲养群 F ₂ captive group	0.003	0.663	*	0.973	0.421	0.522	0.008	1	0.135
多群体 Multi group	0.001	0.756	0.953	0.833	0.483	0.229	0.001	0.994	0.073

* : 该位点仅有 1 个等位基因, 或虽有 2 个等位基因但其中一个仅出现 1 次。

* : There is only one allele at this locus, or two alleles but one of them presents once.

3 讨 论

3.1 多态位点的连锁分析

在微卫星 DNA 分子标记研究中, 用近缘物种的已知微卫星位点, 研究种群的遗传多样性和遗传结构, 是一常用的快捷方法。不过借用的微卫星引物

需经筛选, 选择的微卫星位点在基因组中分布应相对独立, 以使用较少的位点, 获得较广泛的代表性。本研究共筛选出 10 个能在扬子鳄基因组中扩增稳定且特异的微卫星位点, 其中 8 个为多态位点, 连锁分析结果显示, 至少 7 个多态位点间无明显连锁, 表明它们在扬子鳄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。

3.2 微卫星标记揭示的扬子鳄种群遗传多样性现状

在已报道的用微卫星 DNA 作为分子标记进行的种群遗传学研究中, 多选择那些扩增产物多态性较高的微卫星引物, 这无疑增加了所用微卫星位点对所研究对象的区分能力, 但微卫星位点多态性高低与所研究对象本身的遗传多样性水平有很大联系。北美的密西西比鳄在上世纪 60 年代种群数量严重下降后得到全面保护, Glenn 等^[20]对 43 头密西西比鳄研究中, 在 *Ami-13* 位点检测到 5 个等位基因, 但这一位点在扬子鳄却表现为单态, 这在一定程度上反映了扬子鳄种群遗传多样性较密西西比鳄低。在扬子鳄种群 39 个个体中, 每个微卫星多态位点仅检测到 2~4 个等位基因, 平均每个位点 2.38 个等位基因, 而 Glenn 等^[20]用 11 个微卫星位点研究密西西比鳄 43 个体时, 每个位点检测到 4~17 个等位基因, 平均 8.5 个等位基因, 其中 *Ami-13*、*Ami-16*、*Ami-18*、*Ami-15*、*Ami-16*、*Ami-18* 6 个位点的等位基因数分别为 5、7、10、7、5、7 个, 高于扬子鳄的平均每个位点的等位基因数(表 3)。

杂合度反映各群体在多个座位上的遗传变异^[21], 是度量群体遗传变异的一个最适参数^[16]。Glenn 等^[20]用 11 个微卫星位点对美国佛罗里达和路易斯安那两州的密西西比鳄研究发现, H_o 、 H_e 分别为 0.466 和 0.482。Davis 等^[22]用 8 个微卫星位点对美国东南部 12 个地点的密西西比鳄研究得到 H_o 、 H_e 分别为 0.694 和 0.723。本研究得到扬子鳄种群的 H_o 、 H_e 分别为 0.374、0.350, 明显低于密西西比鳄。可见扬子鳄的遗传多样性水平要大大低于其近缘种密西西比鳄, 不过它目前的 H_e 仍高于在 18 世纪时濒临灭绝的阿尔卑斯野生山羊 (*Capra ibex*) 的 $H_e = 0.13$ ^[23]。

多态信息含量是衡量位点多态性的较好指标。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; 当 $PIC < 0.25$ 时该位点表现为低度多态^[21]。由表 3 可知, 在扬子鳄种群的 8 个微卫星多态位点中, *Ami-18* 与 *Ami-18* 表现为高度多态, *Ami-16*、*Ami-212*、*Ami-222* 与 *Ami-224* 表现为中度多态, 余下两个位点则表现为低度多态, 平均 PIC 值为 0.327。Rooney 等^[11]用 20 个微卫星位点测

得濒危动物弓头鲸的平均 PIC 值为 0.4717, 高于扬子鳄。

以上分析表明, 与其他濒危动物相比, 扬子鳄种群的遗传多样性已经非常贫乏。这不仅是目前的饲养种群中的遗传多样性十分低下^[5,6], 在本研究作为野生群体处理的 9 件样品中, 有 6 件为上世纪 70 年代前采集的标本, 1 件为这一时期从农民手中购得并于动物园中饲养至今的扬子鳄, 从遗传上这 7 件样品均完全独立于 80 年代初建起的安徽扬子鳄养殖场中的鳄群, 以及后来由该养殖场引种到他处的扬子鳄群, 较真实地反映了野生群体的遗传多样性状况。因此, 本研究结果提示扬子鳄至少在上世纪 50 年代起种群的遗传多样即已很低。

3.3 近期瓶颈效应对扬子鳄种群的影响

群体在经历遗传瓶颈的过程中, 等位基因多样性减少较杂合度减少要快, 而且这一作用将保持数代直至群体再次回到遗传平衡状态^[15], 因此我们可以用杂合度过度对某群体近期是否经历遗传瓶颈进行检测; 另一方面, 某一位点上的等位基因数目对群体大小的波动也较为敏感, 也可作为瓶颈效应检测的一种指标^[16,17]。本研究用 BOTTLENECK 软件对扬子鳄种群分析的结果显示, 野生群、 F_1 代和 F_2 饲养群都表现出杂合度过度, 同时在扬子鳄种群 39 个个体中 8 个微卫星多态位点每个仅检测到 2~4 个等位基因, 这与扬子鳄种群近数十年来经历了十分严重的瓶颈效应的种群历史相吻合, 即由于遗传瓶颈的严重影响, 许多低频等位基因已经丢失。

我们在扬子鳄饲养种群的遗传多样性研究时已指出, 近 50 年的种群迅速衰退是扬子鳄遭受到的第一次瓶颈效应, 饲养种群的奠基者效应是第 2 次瓶颈效应^[6]。依据等位基因多样性及等位基因频率在 3 群体中的分布(表 4), 不难看出野生群与饲养种群无明显差异, 即奠基者数量对饲养种群遗传多样性的并未造成明显影响, 因此目前扬子鳄种群遗传多样性贫乏的主要原因是近期野生群衰退, 个体数迅速减少, 分布区大幅缩小造成的。

3.4 哈迪-温伯格平衡分析

微卫星 DNA 本身是选择中性的, 不受选择的压力, 在一个理想群体中, 各等位基因在群体中的分布频率应该是稳定的。对扬子鳄各群体的哈迪-温伯格平衡分析发现, 本研究讨论的 8 个多态位点中, 有

6个在各群体中都处于平衡状态,而 $Ami-16$ 和 $Ami-222$ 两个位点在 F_2 代却呈现极显著的偏离遗传平衡。目前,扬子鳄饲养种群的交配繁殖没有人工选择的干预,群体中也无明显的迁入与迁出,这一现象的出现有两种原因可以解释:一是这两个位点的等位基因在 F_2 代受到某种因素的选择;其次是样品数量不够大,由于统计误差造成。对于后一个影响因素的排除只要扩大 F_1 和 F_2 的采样数,进一步统计分析便可解决。但第一种可能的原因须引起我们足够的重视,在前面的讨论已表明 $Ami-16$ 和 $Ami-222$ 两个位点是互不连锁的。扬子鳄饲养种群的繁殖率研究已揭示 F_1 代繁殖过程中产卵的受精率要低于亲代,而 F_2 幼鳄的畸形率显著高于 F_1 代幼鳄,这一现象的出现可能与现行的养殖模式下无法有效地避免近亲交配有关^[4]。虽然现有的数据尚不能完全肯定这两个位点一定与某个纯合致病或致死等位基因连锁,但这一研究结果表明微卫星位点的连锁不平衡分析,在扬子鳄群体中有害等位基因的筛查和避免因近亲交配造成畸胎率上升、提高繁殖成功率将是十分有用的分子标记工具。

3.5 扬子鳄遗传多样性保护对策分析

从等位基因分布频率的计算结果可以看到,在对扬子鳄野生群、 F_1 代及 F_2 饲养群共39个个体所分析的8个多态位点中共检测到21等位基因,其中有5个等位基因只在部分群体中检测到,且这5个等位基因以及等位基因 $Ami-16-2$ 在扬子鳄种群中的分布频率都很低(表4)。这种低频等位基因在取样数量有限的情况下,往往会丢失,有时检测不到。这给我们一个重要提示:扬子鳄饲养繁殖过程中,由于养殖场的空间限制,不能让全部个体得到有效的繁殖,这样会导致群体中某些低频等位基因的丢失,进而使群体的遗传多样性进一步降低。因此在目前的养殖模式下,虽然饲养种群的个体数可以增加,但经历数代繁殖、亲鳄退出繁殖群体后,扬子鳄种群的遗传多样性水平将得不到保持。所幸的是,国家林业局正在实施一项扬子鳄放归计划,将养殖的扬子鳄放回自然,重建野生扬子鳄种群,但这又引出一个新问题:即为了最大限度地保存扬子鳄的遗传多样性,避免低频等位基因的丢失,应怎样选择放归的个体和确定每一放归地的个体数量(相当于一个独立的繁殖群体)?本研究结果提示,当一个等位基因在

扬子鳄群体中的分布频率低于0.145时,在随机抽取的9个样品中仍可能丢失该基因(表4)。因此,在放归实施过程中,除了要考虑生态学因素和管理成本外,保持种群遗传多样性的遗传学因素必须同时加以考虑。

有效种群大小与一个种群的遗传多样性水平密切相关^[16,24],因此确定种群在特定条件下的有效种群大小,对防止近亲繁殖和保持种群遗传多样性有一定的意义^[28]。由于目前扬子鳄饲养种群 F_1 与 F_2 代的有效种群都较小,因此在建立新的饲养群体或野外放归之前,我们应充分考虑其有效种群大小这一因素,使得这些群体不至于因个体数目过少而丢失已有的遗传多样性。

关于饲养种群的遗传管理,虽然通过谱系建立,有可能达到避免“近交衰退”的目的,这里且不论“近交”是否一定会造成衰退的问题,单纯地采用避免“近交”的办法在保持种群的遗传多样方面却往往不能完全奏效,因为低频等位基因即使在没有发生“近交”的情况下仍会出现遗传漂变,致使低频等位基因丢失。我们在前文中已提出建议将宣州和长兴两地的养殖群体作为同一进化显著性单元(ESU)加以管理,把注意力集中在稀有等位遗传型个体的发现上^[6]。本研究进一步发现,野生群体和养殖群体间的等位基因分布差异不明显,因此有理由认为应将全部现存的扬子鳄作为一个整体加以保护,尽快查清扬子鳄的等位基因分布状况,特别是低频等位基因。在养殖场中为低频等位基因携带者提供更多的繁殖机会,使这些低频等位基因在种群中的分布频率得到提高,避免因随机漂变而丢失,从而最大限度的保持扬子鳄种群尚存的遗传多样性。

致谢:感谢南京师范大学生命科学学院徐信荣、赵强两位先生在标本采集中给予的帮助,安徽省扬子鳄繁殖研究中心、安徽铜陵白暨豚保护区和南京红山动物园濮燕群女士提供部分血样标本。

参考文献(References):

- [1] DING You Zhong, WANG Xiao Ming, HE Li Jun, SHAO Min, XIE Wan Shu, Thorbjarnarson B J, McMurry S T. Study on the current population and habitat of the wild Chinese alligator (*Alligator sinensis*). *Biodiversity science*, 2001, 9(2): 102~108.
- 丁由中, 王小明, 何利军, 邵民, 谢万树, Thorbjarnarson B J, McMurry S T. 野生扬子鳄物种及栖息地现状研究. *生物多样性*, 2001, 9(2): 102~108.

- [2] Thorbjarnarson J, WANG Xiao Ming. The conservation status of the Chinese alligator. *Oryx*, 1999, 33(2): 152~ 159.
- [3] Thorbjarnarson J, WANG Xiao Ming, SHAO Min, HE Li Jun, DING Youzhong, WU Yue Long, McMurry S T. Wild populations of the Chinese alligator approach extinction. *Biological Conservation*, 2002, 103(1): 93~ 102.
- [4] WU Xiao Bing, WANG Yi Quan, ZHOU Kai Ya, NIE Ji Shan, WANG Chao Lin, XIE Wang Shu. Analysis on reproduction of captive population of *Alligator sinensis* in Xuanzhou, Anhui. *Chin J Appl Environ Biol*, 1999, 5(6): 585~ 588.
吴孝兵, 王义权, 周开亚, 聂继山, 王朝林, 谢万树. 安徽省宣州扬子鳄饲养种群繁殖现状分析. 应用与环境生物学报, 1999, 5(6): 585~ 588.
- [5] WU Xiao Bing, WANG Yi Quan, ZHOU Kai Ya, ZHU Wei Quan, NIE Ji Shan, WANG Chao Lin, XIE Wang Shu. Genetic variation in captive population of Chinese alligator, *Alligator sinensis*, revealed by random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Biological Conservation*, 2002, 106(3): 435~ 441.
- [6] WANG Yi Quan, ZHU Wei Quan, WANG Chao Lin. D-loop Sequence variation of mitochondrial DNA in captive Chinese alligator. *Acta Genetica Sinica*, 2003, 30(5): 425~ 430.
王义权, 朱伟铨, 王朝林. 扬子鳄饲养种群线粒体 DNA 控制区的序列多态性. 遗传学报, 2003, 30(5): 425~ 430.
- [7] Powell W, Morgante M, Andre C, Hanafey M, Voegele J, Rafalski A. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for genoplasm analysis. *Mol Breed*, 1996, 12: 225~ 238.
- [8] Russell J R, Fuller J D, Macaulay M, Hatz B G, JaHoor A, Powell W, Waugh R. Direct comparison of levels of genetic variation among barley accessions detected by RFLPs, AFLPs, SSRs and RAPDs. *Theor Appl Genet*, 1997, 95: 714~ 722.
- [9] ZHANG Yun Wu, ZHANG Ya Ping. Microsatellites and Its Application. *Zoological Research*, 2001, 22(4): 315~ 320.
张云武, 张亚平. 微卫星及其应用. 动物学研究, 2001, 22(4): 315~ 320.
- [10] Houkden B A, England P R, Taylor A C, Greville W D, Sherwin W B. Low genetic variability of the koala (*Phascolarctos cinereus*) in southern eastern Australia following a severe population bottleneck. *Mol Ecol*, 1996, 5(2): 269~ 281.
- [11] Rooney A P, Honeycutt R L, Davis S K, Derr J N. Evaluating a putative bottleneck in a population of bowhead whale from patterns of microsatellite diversity and genetic disequilibria. *Mol Evol*, 1999, 49: 682~ 690.
- [12] Smith J S C, Chin E, Shu H, Smith O S, Wall S J, Senior L, Mitchell S, Kresovich S, Ziegler J. An evolution of the utility of SSR loci as molecular markers in maize (*Zea mays* L.): comparisons with data from RFLPs and pedigree. *Theor Appl Genet*, 1997, 95: 163~ 176.
- [13] Nei M. Molecular evolutionary genetics. New York: Columbia University Press, 1987.
- [14] Lehmann T, Hawley W A, Grebert H, Collins F H. The effective population size of *Anopheles gambiae* in Kenya: implications for population structure. *Mol Biol Evol*, 1998, 15(3): 264~ 276.
- [15] Cornuet J M, Luikart G. Description and Power Analysis of Two Tests for Detecting Recent Population Bottlenecks From Allele Frequency Data. *Genetics*, 1996, 144: 2001~ 2014.
- [16] Nei M, Maruyama T, Chakraborty R. The bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evolution*, 1975, 29: 1~ 10.
- [17] Maruyama T, Fuerst P A. Population bottleneck and nonequilibrium models in population genetics II. Number of alleles in a small population that was formed by a recent bottleneck. *Genetics*, 1985, 111(3): 675~ 689.
- [18] Raymond M, Rousset F. GENEPOP(version 1. 2): population genetics software for exact tests and ecumemicism. *J Heredity*, 1995, 86: 248~ 249.
- [19] Davis L M, Glenn T C, Elsey R M, Dessauer H C, Sawyer R H. Multiple paternity and mating patterns in the American alligator, *Alligator mississippiensis*. *Mol Ecol*, 2001, 10: 1011~ 1024.
- [20] Glenn T C, Dessauer H C, Braun M J. Characterization of microsatellite DNA loci in american alligators. *Copeia*, 1998, 3: 591~ 601.
- [21] NIU Rong, SHANG Hai Tao, WEI Hong, HUANG Zhong Bo, ZENG Yang Zhi. Genetic Analysis of 35 microsatellite loci in 5 lineages of Xishuangbanna miniature pig inbred line. *Acta Genetica Sinica*, 2001, 28(6): 518~ 526.
牛荣, 商海涛, 魏泓, 黄中波, 曾养志. 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, 2001, 28(6): 518~ 526.
- [22] Davis L M, Glenn T C, Strickland D C, Louis J G, Elsey R M, Rhodes W E, Dessauer H C, Sawyer R H. Microsatellite DNA Analyses Support an East West Phylogeographic Split of American Alligator Populations. *Mol Dev Evol*, 2002, 294: 352~ 372.
- [23] Maudet C, Miller C, Bassano B, Breitenmoser Wüsten C, Gauthier D, Obexer-Ruff G, Michallet J, Taberlet P, Luikart G. Microsatellite DNA and recent statistical methods in wildlife conservation management: applications in Alpine ibex [*Capra ibex (ibex)*]. *Mol Ecol*, 2002, 11: 421~ 436.
- [24] Wright S. Evolution in Mendelian populations. *Genetics*, 1931, 16: 97~ 159.
- [25] Leberg P L. Effects of population bottlenecks on genetic diversity as measured by allozyme electrophoresis. *Evolution*, 1992, 46: 477~ 494.
- [26] Luikart G, Allendorf F W, Cornuet J M, Sherwin W B. Distortion of allele frequency distributions provides a test for recent population bottlenecks. *J Hered*, 1998, 89(3): 238~ 247.
- [27] ZHANG Da Yong, JIANG Xin Hua. Progress in studies of genetic diversity and conservation biology of endangered plant species. *Chinese Biodiversity*, 1999, 7(1): 31~ 37.
张大勇, 姜新华. 遗传多样性与濒危植物保护生物学研究进展. 生物多样性, 1999, 7(1): 31~ 37.
- [28] Simberloff D. The contribution of population and community biology to conservation science. *Annual Reviews of Ecology and Systematics*, 1988, 19: 473~ 511.