

# 喜马拉雅旱獭种群微卫星变异及遗传多样性

徐金会<sup>①</sup> 王琳琳<sup>①</sup> 薛慧良<sup>①</sup> 王玉山<sup>②</sup> 徐来祥<sup>①\*</sup>

(<sup>①</sup>曲阜师范大学生命科学学院 曲阜 273165; <sup>②</sup>中国科学院动物研究所 北京 100101)

**摘要:** 为了解不同地理种群喜马拉雅旱獭 (*Marmota himalayana*) 的种群数量变化并探讨其内在的遗传学机制, 通过构建部分基因组文库的方法筛选出 8 个高变异微卫星位点, 根据微卫星位点的测序结果设计相应引物, PCR 扩增检测了青藏高原 4 个地理种群(德令哈、乌兰、沱沱河、安多)喜马拉雅旱獭的遗传多态性及其种群结构。研究结果显示: 8 个位点在喜马拉雅旱獭种群中均为高度多态, 观察等位基因数、有效等位基因数、多态信息含量分别为 4.75、3.033 2、0.610 2; 喜马拉雅旱獭种群总的期望杂合度和观察杂合度分别为 0.670、0.699; 3 个喜马拉雅旱獭种群显著 ( $P < 0.05$ ) 或极显著 ( $P < 0.01$ ) 偏离 HW 平衡状态, 且这些偏离平衡的位点均由杂合过度导致 ( $F_{IS} < 0$ ); 喜马拉雅旱獭种群的部分位点已经偏离了突变漂移平衡。结论: 筛选出的 8 个微卫星位点适合于喜马拉雅旱獭种群遗传多样性的研究, 所研究的喜马拉雅旱獭种群有较高的遗传多样性, 安多地理种群在近期可能经历过瓶颈效应, 种群数量曾经下降。

**关键词:** 微卫星标记; 遗传多态性; 瓶颈效应; 喜马拉雅旱獭

中图分类号: Q341, Q958 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263(2009)02-34-07

## Microsatellite Variation and Genetic Diversity in *Marmota himalayana*

XU Jin Hui<sup>①</sup> WANG Lin Lin<sup>①</sup> XUE Hui Liang<sup>①</sup> WANG Yu Shan<sup>②</sup> XU Lai Xiang<sup>①\*</sup>

(<sup>①</sup> College of Life Science, Qufu Normal University, Qufu, Shandong 273165;

<sup>②</sup> Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

**Abstract:** To understand the changes in the number and the genetic mechanism of Himalayan Marmot (*Marmota himalayana*), 4 geographical populations (Delhi, Ulan, Tuotuohe and Ando) living in the Qinghai Tibet Plateau were investigated using microsatellite data. Eight microsatellite loci were selected as the molecular markers. The allele numbers, effective allele numbers and polymorphism information content were estimated to characterize genetic diversity. Tests to detect excess heterozygosity in a population at mutation drift equilibrium were analyzed. The results show that all loci were high polymorphism, the allele numbers, effective allele numbers and polymorphism information content were 4.75, 3.033 2 and 0.610 2, respectively. The expected heterozygosity and the observed heterozygosity were 0.670 and 0.699. Tests of departures from Hardy Weinberg equilibrium indicated many loci with significant heterozygosity excess at  $P < 0.05$ . As a conclusion, the Himalayan marmot population living in the Qinghai Tibet Plateau has a relatively rich diversity; The Ando populations were significantly different from mutation drift equilibrium with heterozygote excesses, they had suffered bottleneck effects in the past as well as the recent population decline.

**Key words:** Microsatellite loci; Genetic diversity; Bottleneck; Himalayan marmot (*Marmota himalayana*)

基金项目 国家科技攻关计划项目 (No. 2004BA718B08), 国家 973 计划项目 (No. 2007CB109104), 国家自然科学基金项目 (No. 30670335), 曲阜师范大学“十一五”计划省级重点建设项目;

\* 通讯作者, E-mail: xuk@qfnu.edu.cn;

第一作者介绍 徐金会, 男, 硕士, 副教授; 研究方向: 动物分子生态学; E-mail: xujinhui@qfnu.edu.cn.

收稿日期: 2008-10-17, 修回日期: 2009-01-05

喜马拉雅旱獭(*Marmota himalayana*)又称中国旱獭,隶属于啮齿目(Rodentia)松鼠科(Sciuridae)旱獭属,主要分布在我国西藏、青海及尼泊尔、印度等地。喜马拉雅旱獭是鼠疫和一些自然疫源性疾病病原体的主要宿主及传播者,其数量众多,分布广泛,是我国危害最大的旱獭<sup>[1,2]</sup>。

种群的遗传多样性水平反映了种群遗传适应的潜力,是评价一个物种抵制自然界各种生存压力能力强弱的重要遗传学指标,关系到种群对环境的适应和生存潜力<sup>[3]</sup>。作为青藏高原上广泛分布的一个物种,喜马拉雅旱獭有着对低温、低氧及强紫外线等高原环境的良好适应能力<sup>[4]</sup>,但目前人们对其遗传变异还知之甚少。微卫星 DNA 标记是近十多年发展起来的一种新型的分子遗传标记,广泛应用于遗传多样性研究等领域。Kruckenhauer 等首先用微卫星标记研究了奥地利和瑞士境内的欧洲旱獭(*M. marmota*)的种群遗传结构<sup>[5]</sup>,随后研究者又筛选了众多微卫星标记研究了灰白旱獭(*M. caligata*)及哥伦比亚黄鼠(*Spermophilus columbianus*)、美洲黄鼠(*S. citellus*)等近缘物种的种群亲缘关系和婚配制度<sup>[6,7]</sup>。Goossens 等应用非损伤取样法提取了法国境内欧洲旱獭的 DNA,系统研究了 12 个单配偶制家族的谱系,得出旱獭的婚配制度与严格意义上的单配偶繁殖体系并不相同,其中存在额外配对机制(extra pair copulation, EPC)<sup>[8]</sup>。近年来,有关喜马拉雅旱獭的分子生物学研究也逐渐出现<sup>[9-11]</sup>,但有关喜马拉雅旱獭的遗传变异及种群分子生态学等方面的研究尚未见报道。已有研究表明,种群大小的变化(如种群扩增或经历瓶颈效应后)将导致种群遗传结构的改变<sup>[12]</sup>。喜马拉雅旱獭是否经历过种群数量波动?其遗传多样性及遗传结构如何?这些都是目前值得关注的问题。

本研究在筛选喜马拉雅旱獭微卫星多态性位点基础上,设计微卫星引物,利用 PCR 方法对青藏铁路沿线 4 个不同地理种群的喜马拉雅旱獭进行了多态性位点的检测和统计分析,并

针对种群及位点进行了哈代-温伯格(Hardy-Weinberg, H-W)平衡分析及瓶颈效应分析。研究结果将为喜马拉雅旱獭的分子生态学研究奠定基础,有助于揭示喜马拉雅旱獭种群的动态变化及其遗传学机制。

## 1 材料与方法

**1.1 动物采样** 喜马拉雅旱獭于 2004 年捕获于青藏铁路沿线,包括青海海西州德令哈市(97.33°E, 37.35°N)、乌兰(98.48°E, 36.93°N)、沱沱河(92.42°E, 34.23°N)和西藏安多地区(91.67°E, 32.26°N)4 个地理种群。每一地理种群各 30 个个体。动物捕获后立即处死,整体浸泡于无水乙醇中保存。

**1.2 基因组 DNA 的提取** 取喜马拉雅旱獭肌肉组织,采用酚-氯仿法<sup>[13]</sup>提取基因组 DNA,琼脂糖凝胶电泳检测其完整性,紫外分光光度计(3300RKD 型,Pharmacia 公司)检测 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>值,在 1.8~2.0 之间。将高质量 DNA 按个体编号,每一个体的 DNA 分两份置 4℃保存。一部分 DNA 用于构建基因组部分文库,另一部分 DNA 保留作 PCR 检测的模板。

**1.3 基因组部分文库的构建** 氯化钙法<sup>[13]</sup>制备新鲜的大肠杆菌感受态细胞 DH5 $\alpha$ 。利用碱裂解法提取质粒 pUC19。用限制性内切酶 *Sau*3A I 消化基因组 DNA,从低熔点琼脂糖凝胶中回收 500~1 000 bp 范围的 DNA 电泳条带,与载体连接转化。蓝白斑方法结合以(CA)<sub>8</sub>寡聚核苷酸引物和 pUC19 质粒多克隆位点两侧的 M13 引物 M3 和 RV 分别配对筛选阳性克隆,将含插入目的片段的阳性克隆送至北京三博远志公司测序。

**1.4 PCR 反应** 通过构建部分基因组文库,在含有明显微卫星序列的 9 个克隆中共得到 13 个微卫星位点(部分克隆中包含两个微卫星位点),将微卫星序列在 GenBank 注册。选择其中的 8 个微卫星位点(均来自不同克隆),利用 Primer Premier 5.0 和 Oligo 6.0 软件设计相应的微卫星引物(表 1),引物由北京三博远志公司合成,用于 PCR 扩增(Tgradient 96 型 PCR 仪,

Biometra)。PCR 反应总体积为 25  $\mu$ l, 包含 10  $\times$  PCR buffer 2.5  $\mu$ l, 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 2.0  $\mu$ l, 2.5 mmol/L dNTP 各 1.5  $\mu$ l, 10 pmol/ $\mu$ l 正反引物各 0.5  $\mu$ l, 1.5 U/ $\mu$ l *Taq* 酶 0.2  $\mu$ l, 模板 1  $\mu$ l (约 80 ng), ddH<sub>2</sub>O 16.8  $\mu$ l。PCR 反应参数如下: 94  $^{\circ}$ C 预变性 10 min; 94  $^{\circ}$ C 变性 1 min, 适宜退火温度退火 1 min, 72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 32 个循环; 72  $^{\circ}$ C 10 min。

**1.5 电泳** 部分 PCR 反应产物先采用 3% 琼脂糖凝胶电泳检测, 获得可重复的清晰的 DNA 条带的反应产物, 再采用 10% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测 (DY-5 型稳压稳流电泳仪, DY-280 双板夹心式垂直槽, 北京六一仪器厂), 电压 200 V, 电泳时间为 2.5 h, 电泳缓冲液为 1  $\times$  TBE。电泳结束后, 银染法显色。

**1.6 统计分析** 对干燥后的聚丙烯酰胺凝胶拍照, 用 Bandscan 软件对图片进行分析, 按照分子量从小到大的顺序对每个个体扩增出的等位基因编号, 记录其基因型。以 Popgen 32 软件进行种群遗传分析, 统计整个群体及各群体的等位基因频率, 以等位基因数 (allele number, Na)、有效等位基因数 (effective allele number, Ne) 等参数估计种群的遗传多样性; 根据 Botstein 等的公式<sup>[14]</sup> 计算各位点的多态信息含量 (polymorphism information content, PIC)。以

Popgen 32 软件对不同种群不同位点的 H W 平衡进行卡方检验。通过种群的突变-漂移平衡 (mutation-drift equilibrium) 模型估计种群数量动态变化。根据各位点的等位基因频率, 基于无限等位基因模型 (infinite allele model, IAM)、逐步突变模型 (stepwise mutation model, SMM) 以及综合二者的双相突变模型 (two-phased model of mutation, TPM) (10% IAM + 90% SMM), 利用 Bottleneck 3.4 软件<sup>[15]</sup> 计算平均期望杂合度 ( $H_E$ )。对 Bottleneck 分析时, 设置 1 000 个重复, 并通过 Wilcoxon 符号秩检验 (Wilcoxon sign-rank test) 分析杂合过度, 估测种群是否经历瓶颈效应的影响。

## 2 结果

### 2.1 喜马拉雅旱獭微卫星位点的遗传多样性

聚丙烯酰胺凝胶电泳检测结果显示, 扩增片段均呈现出多态性, 部分位点的电泳结果如图 1 所示。8 个微卫星位点在 4 个喜马拉雅旱獭种群中共检测到 38 个等位基因, 平均每个位点的等位基因数目为 4.75 个。各位点的  $N_e$ 、PIC 范围分别为 2.583 4 ~ 3.657 1、0.539 6 ~ 0.676 1, 其平均值分别为 3.033 2、0.610 2。SSR7 的  $H_e$ 、PIC 等指标均为各位点中的最大值, 而 SSR9 的这些指标均为最小值 (表 1)。

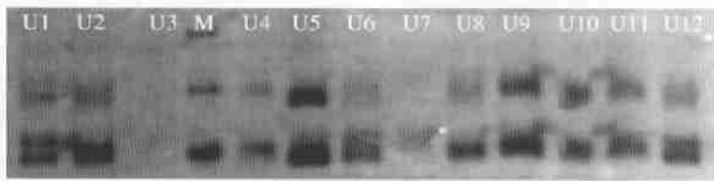


图 1 喜马拉雅旱獭微卫星位点 SSR7 在部分种群个体扩增产物的聚丙烯酰胺凝胶电泳结果

Fig. 1 Polyacrylamide gel electrophoresis of PCR products of microsatellites locus SSR7 of *Marmota himalayana*

M: DNA 分子量标记; U1~ U12: 个体编号。M: DNA ladder marker; U1~ U12: Sample number.

**2.2 H W 平衡分析及瓶颈效应分析** 计算各位点在各种群中的基因频率、不同种群各位点的期望杂合度 ( $H_E$ )、观测杂合度 ( $H_O$ ), 并用群体内近交系数  $F_{IS}$  衡量偏离 H W 平衡的程度 (表 2)。喜马拉雅旱獭 4 个种群杂合度各不相同, 各种群的  $H_E$  变化范围为 0.532 (沱沱河) ~

0.612 (乌兰),  $H_O$  变化范围为 0.604 (沱沱河) ~ 0.833 (安多)。对各位点进行的多群体检测 (multi-population test) 发现, 各种群的各位点均表现出极显著的不平衡 ( $P < 0.01$ )。对各种群进行的多位点检测 (multi-locus test) 发现, 除了乌兰种群外, 其他 3 个喜马拉雅旱獭种群显著

( $P < 0.05$ ) 或极显著 ( $P < 0.01$ ) 偏离遗传平衡致 ( $F_{IS} < 0$ )。状态,且这些偏离平衡的位点均由杂合过度导

表 1 喜马拉雅旱獭微卫星位点的引物序列及遗传多样性

Table 1 Primer sequence and genic diversity of *Marmota himalayana* for microsatellite loci

位点 Locus	登录号 Accession number	引物序列 Primer sequences	等位基因数 Number of alleles	有效等位基因数 Effective number of alleles	多态信息含量 Polymorphism information content
SSR2	EF676085	F: GAAATAGGCTGGTCCGTG R: CATACTTGATAGATGGTGGTG F: GTCGTTCAGGAGCCATC	5	2.910 0	0.612 1
SSR3	EF676086	R: CTCATCCAGCCTTAGTGTAG F: GATGGGTCAAATAATGGTAC	4	3.223 6	0.632 6
SSR4	EF676088	R: ATGTGAAGGGTTGGGGTT F: GGGAAAACCAAAATCTGAAC	5	3.160 3	0.619 1
SSR5	EF676087	R: ACAGCAAATCTCCACCA F: ACATTGCTACCACTGCTGCTCC	5	2.826 0	0.579 8
SSR7	EF676090	R: GACCCAGACTGAATTACATCAT F: CTCTCTTCTTCCGCATA	4	3.657 1	0.676 1
SSR9	EF676084	R: AACTCAAGTGAGACCCTGT F: GCCTGTTTGAAGACTGAT	4	2.583 4	0.539 6
SSR10	EF555519	R: TGACCTAAAGAAATGCTAT F: TCAGAAATGCAA CCCAGAC	6	3.049 9	0.622 0
SSR11	EF676089	R: GCCCAACAGAAGGAAC	5	2.855 4	0.600 2

表 2 喜马拉雅旱獭种群各位点的杂合度及 Hardy-Weinberg 平衡检验

Table 2 Heterozygosity and Hardy Weinberg equilibrium test of *Marmota himalayana*

种群 Population	SSR2	SSR3	SSR4	SSR5	SSR7	SSR9	SSR10	SSR11	多位点 Multilocus
D $H_E$	0.651	0.484	0.695	0.495	0.617	0.508	0.682	0.524	0.582
$H_O$	0.600	0.633	0.733	0.733	0.467	0.433	1.000	0.800	0.675
$F_{IS}$	0.063*	-0.330*	-0.073**	-0.507*	0.231**	0.132*	-0.491**	-0.553*	-0.191*
U $H_E$	0.714	0.552	0.676	0.503	0.753	0.595	0.554	0.551	0.612
$H_O$	0.667	0.600	0.633	0.700	1.000	0.500	1.000	0.367	0.683
$F_{IS}$	0.051*	-0.105	0.048**	-0.416	-0.351**	0.145**	-0.835**	0.325**	-0.143
T $H_E$	0.447	0.748	0.683	0.471	0.538	0.472	0.572	0.305	0.532
$H_O$	0.400	0.900	0.667	0.600	0.567	0.333	1.000	0.367	0.604
$F_{IS}$	0.128*	-0.225**	0.007**	-0.297	-0.070**	0.282	-0.779**	-0.225	-0.147*
A $H_E$	0.658	0.745	0.686	0.600	0.742	0.183	0.525	0.600	0.592
$H_O$	0.467	1.000	1.000	1.000	1.000	0.200	1.000	1.000	0.833
$F_{IS}$	0.278*	-0.366**	-0.483**	-0.695*	-0.371**	-0.111	-0.938**	-0.695**	-0.422*
MP $H_E$	0.659	0.693	0.686	0.649	0.730	0.616	0.675	0.653	0.670
$H_O$	0.533	0.783	0.758	0.758	0.758	0.367	1.000	0.633	0.699
$F_{IS}$	0.187*	-0.136**	-0.109**	-0.174*	-0.044**	0.402*	-0.488**	0.025**	-0.042*

D. 德令哈种群; U. 乌兰种群; T. 沱沱河种群; A. 安多种群; MP. 多种群;  $H_E$ . 期望杂合度;  $H_O$ . 观察杂合度;  $F_{IS}$ . 群体内近交系数; \* 差异显著 ( $P < 0.05$ ); \*\* 差异极显著 ( $P < 0.01$ )。

D. Population of Delhi; U. Population of Ulan; T. Population of Tuotuohe; A. Population of Ando; MP. Multipopulation;  $H_E$ . Expected heterozygosities;  $H_O$ . Observed heterozygosities;  $F_{IS}$ . The inbreeding coefficients within the subpopulation; \* Significant difference at  $P < 0.05$ ; \*\* Significant difference at  $P < 0.01$ .

基于 IAM、TPM 和 SMM 的假设, 得到喜马拉雅旱獭种群在 3 种突变模型下期望杂合度  $H_{EQ}$ (表 3)。在 IAM 的假设下, 喜马拉雅旱獭种群 SSR3 位点和 SSR7 位点的  $H_E$  显著高于  $H_{EQ}$ ,

其中 SSR7 位点  $H_E$  与  $H_{EQ}$  的差异极显著; 在 TPM 和 SMM 的假设下, 只有 SSR7 位点的  $H_E$  显著高于  $H_{EQ}$ , 而在所有其他位点  $H_E$  与  $H_{EQ}$  的差异均不显著。

表 3 喜马拉雅旱獭微卫星位点瓶颈效应分析

Table 3 Test for bottleneck effect by locus in *Marmota himalayana*

位点 Locus	个体数 Sample number	$H_E$	IAM			TPM			SMM		
			$H_{EQ}$	DH/sd	P	$H_{EQ}$	DH/sd	P	$H_{EQ}$	DH/sd	P
SSR2	120	0.662	0.500	0.980	0.171	0.630	0.302	0.459	0.664	-0.021	0.393
SSR3	120	0.696	0.421	1.541	0.018*	0.543	1.206	0.063	0.582	1.018	0.117
SSR4	120	0.689	0.501	1.105	0.108	0.625	0.608	0.328	0.664	0.295	0.477
SSR5	120	0.652	0.492	0.935	0.204	0.626	0.239	0.496	0.662	-0.116	0.369
SSR7	120	0.733	0.422	1.742	0.008**	0.547	1.400	0.015*	0.581	1.413	0.013*
SSR9	120	0.618	0.407	1.157	0.124	0.547	0.567	0.344	0.578	0.367	0.430
SSR10	120	0.678	0.554	0.781	0.241	0.687	-0.103	0.372	0.724	-0.683	0.212
SSR11	120	0.655	0.500	0.936	0.189	0.621	0.326	0.454	0.662	-0.074	0.373

DH/sd.  $H_E$  与  $H_{EQ}$  的差与标准偏差 (standard deviation, sd) 之比; \*  $H_E$  与  $H_{EQ}$  差异显著 ( $P < 0.05$ ); \*\*  $H_E$  与  $H_{EQ}$  差异极显著 ( $P < 0.01$ )。

DH/sd. Ratio of ( $H_E/H_{EQ}$ ) to the standard deviation of  $H_{EQ}$ ; \* Significant difference at  $P < 0.05$ ; \*\* Significant difference at  $P < 0.01$ .

Wilcoxon 符号秩检验(杂合过度单尾检测)的结果表明(表 4), 在 IAM 的假设下, 喜马拉雅旱獭各地理种群均偏离了突变-漂移平衡, 表现出极显著性的杂合过剩 ( $P < 0.01$ ); 在 TPM 的假设下, 安多地理种群偏离了突变-漂移平衡, 表现出显著性 ( $P < 0.05$ ) 的杂合过剩。在 SMM

的假设下, 各喜马拉雅旱獭地理种群虽然显示出杂合过剩, 但均未达到显著性水平 ( $P > 0.05$ )。

表 4 喜马拉雅旱獭不同地理种群中  
瓶颈效应估测的符号秩检验

Table 4 Wilcoxon sign rank test of bottleneck estimate in *Marmota himalayana* geographic populations

种群 Population	个体数 Sample number	P 值 P value (one tail for H excess)		
		IAM	TPM	SMM
D	30	0.004**	0.273	0.809
U	30	0.004**	0.156	0.273
T	30	0.010**	0.273	0.527
A	30	0.004**	0.014*	0.098

D. 德令哈种群; U. 乌兰种群; T. 沱沱河种群; A. 安多种群; \* 显著偏离突变-漂移平衡 ( $P < 0.05$ ); \*\* 极显著偏离突变-漂移平衡 ( $P < 0.01$ )。

D. Population of Delhi; U. Population of Ulan; T. Population of Tuotuohe; A. Population of And; \* Significant deviation from mutation drift equilibrium at  $P < 0.05$ ; \*\* Significant deviation from mutation drift equilibrium at  $P < 0.01$ .

### 3 讨论

3.1 喜马拉雅旱獭具有丰富的遗传多样性  
在用微卫星 DNA 作为分子标记进行种群遗传学研究时, 多选择那些扩增产物多态性较高的微卫星引物, 以增加所用微卫星位点对所研究对象的区分能力<sup>[16]</sup>。等位基因数、有效等位基因数和多态信息含量都是衡量位点多态性的较好指标<sup>[14, 17, 18]</sup>。本研究所得 8 个微卫星位点中, 每个位点的平均等位基因数目为 4.75 个, 有效等位基因数达到 3.033 2, 多态信息含量为 0.610 2, 说明各位点均较适于遗传多样性研究。

杂合度反映各群体在多个座位上的遗传变异, 其中期望杂合度不依赖于样本数量, 一般被认为是度量群体遗传变异水平的最适参数<sup>[9]</sup>。研究显示, 喜马拉雅旱獭 8 个位点的期望杂合度在 0.616~0.730 之间, 多种群多位点的期望杂合度为 0.670, 略低于阿尔卑斯山区的欧洲

旱獭的 0.73<sup>[20]</sup>, 略高于另一种在青藏高原上分布广泛、数量众多的土著动物高原鼠兔 (*Ochotona curzoniae*) 的 0.485 4~ 0.538 2<sup>[21]</sup>, 提示喜马拉雅旱獭种群拥有丰富的遗传多样性, 也说明喜马拉雅旱獭种群受选择、突变和遗传漂变等因素的综合影响较大。另外, 4 个地理种群的微卫星平均期望杂合度在 0.532~ 0.612 之间, 其中乌兰种群的期望杂合度相对较高, 其次是安多和德令哈种群, 最低是沱沱河种群, 这反映出青藏高原不同地理种群的喜马拉雅旱獭群体间遗传变异水平已有差异。

**3.2 喜马拉雅旱獭种群的遗传变异** 种群处于 H-W 平衡的重要前提是种群足够的大, 种群内随机交配, 无等位基因突变, 不考虑动物的迁徙等<sup>[22]</sup>。当种群处于 H-W 平衡时, 各等位基因在群体中分布频率应该是相对稳定, 观察杂合度与期望杂合度之间没有显著的差异。本研究结果表明, 4 个喜马拉雅旱獭种群多数位点显著偏离了 H-W 平衡, 且这些偏离平衡的位点均由杂合子过剩导致 ( $F_{IS} < 0$ )。

处于突变-漂移平衡下的种群, 微卫星位点显示杂合过度与杂合不足的概率应大致相等。种群在进化中经历瓶颈效应后, 等位基因数目和杂合度均会降低, 其中等位基因丢失比杂合度降低速度快, 从而导致杂合过度, 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<sup>[23]</sup>, 因此通过分析杂合度是否过度可以判断种群数量是否下降<sup>[15]</sup>。从表 3 可以看出, 在 IAM 的假设下, 喜马拉雅旱獭种群在所有位点表现出杂合过度, 其中 SSR3 位点的  $H_E$  与  $H_{EQ}$  的差异显著, SSR7 位点的  $H_E$  与  $H_{EQ}$  的差异达到极显著水平; 在 TPM 的假设下, 除 SSR10 位点表现为杂合不足外, 其余 7 个位点均表现为杂合过度, 但只有 SSR7 位点的杂合过度达到显著性差异。因此, 从微卫星变异情况来看, 青藏高原喜马拉雅旱獭种群的部分位点已经偏离了突变-漂移平衡。从 Wilcoxon 符号秩检验的结果来看, 在 IAM 和 TPM 进化模式下, 喜马拉雅旱獭安多地理种群均具有显著的杂合过度位点, 显示出安多地理种群的喜马拉雅旱獭在近

期经历过瓶颈效应, 种群数量曾经下降, 这也可以部分解释各地理种群之间存在的遗传变异水平的差异。至于瓶颈效应产生的原因, 尚待进一步的研究。

## 参 考 文 献

- [1] 李敏. 1954~ 1996 年喜马拉雅旱獭鼠疫疫源地动物鼠疫流行态势. 地方病通报, 1999, 14(2): 25~ 26.
- [2] 范薇. 盐酸氯胺酮对喜马拉雅旱獭制动物性麻醉的效果. 中国人兽共患病学报, 2007, 23(4): 418.
- [3] Frankham R, Ballou J D, Briscoe D A. Introduction to Conservation Genetics. Cambridge: Cambridge University Press, 2002, 78~ 104.
- [4] 陈钦铭, 叶于聪, 夏寅明. 对不同年龄喜马拉雅旱獭大脑皮质结构与血液气体测定的比较研究. 兽类学报, 1992, 12(1): 25~ 30.
- [5] Kruckenhauer L, Miller W J, Preleuthner M, et al. Differentiation of Alpine mamot populations traced by DNA fingerprinting. *Journal of the Zoological Systematic and Evolution Research*, 1997, 35: 143~ 149.
- [6] Da Silva A, Luikart G, Allainé D, et al. Isolation and characterization of microsatellites in European alpine mamots (*Marmota marmota*). *Molecular Ecology Notes*, 2003, 3: 189~ 190.
- [7] Kyle C J, Karels T J, Clark B, et al. Isolation and characterization of microsatellites markers in hoary mamots (*Marmota caligata*). *Molecular Ecology Notes*, 2004, 4: 749~ 751.
- [8] Goossens B, Graziani L, Waits L P, et al. Extra pair paternity in the monogamous Alpine mamot revealed by nuclear DNA microsatellite analysis. *Behavioral Ecology & Sociobiology*, 1998, 43: 281~ 288.
- [9] Lu Y, Wang B, Huang H, et al. The interferon alpha gene family of *Marmota himalayana*, a Chinese mamot species with susceptibility to woodchuck hepatitis virus infection. *Dev Comp Immunol*, 2008, 32(4): 445~ 457.
- [10] 黄凰, 杨燕, 刘嘉等. 中国旱獭去唾液酸糖蛋白受体 H1 和 H2 亚基糖基识别域的原核表达及复性. 医学分子生物学杂志, 2006, 3(4): 255~ 259.
- [11] 李安意, 王宝菊, 田拥军等. 中国旱獭 II-10 分子的克隆和序列分析. 医学分子生物学杂志, 2006, 3(5): 344~ 346.
- [12] Estoup A, Angers B. Microsatellites and minisatellites for molecular ecology: theoretical and empirical considerations. In: Carvalho G R ed. *Advances in Molecular Ecology*. Sicily, Italy: IOS Press, 1998, 55~ 86.

- [13] Sambrook J, Fritsh E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual* (2nd ed). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [14] Botstein D, White R L, Skolnick M, *et al.* Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet*, 1980, **32**(3): 314~ 331.
- [15] Comuet J M, Luikart G. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics*, 1996, **144**: 2 001~ 2 014.
- [16] 黄磊, 王义权. 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. *遗传学报*, 2004, **31**(2): 143~ 150.
- [17] 储明星, 程金华, 过纬. 微卫星标记 OarAE101 和 BM 1329 在五个绵羊品种中的初步研究. *遗传学报*, 2001, **28**(6): 510~ 517.
- [18] 苑存忠, 王建民, 马月辉等. 山东省地方绵羊品种微卫星遗传多态性. *应用生态学报*, 2006, **17**(8): 1 459~ 1 464.
- [19] Gutiérrez Espeleta G A, Kalinowski S T, Boyce W M, *et al.* Genetic variation and population structure in desert bighorn sheep: implications for conservation. *Conservation Genetics*, 2000, **1**(1): 3~ 15.
- [20] Goossens B, Chikhi L, Taberlet P, *et al.* Microsatellite analysis of genetic variation among and within Alpine marmot populations in the French Alps. *Mol Ecol*, 2001, **10**(1): 41~ 52.
- [21] 周乐, 殷宝法, 杨生妹等. 青藏公路对高原鼠兔种内遗传分化的影响. *生态学报*, 2006, **26**(11): 3 572~ 3 577.
- [22] Hartl D L, Clark A G. Organization of genetic variation. In: Hartl D L, Clark A G eds. *Principles of Population Genetics* (3rd ed). Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates Inc. Publishers, 1997, 74~ 110.
- [23] 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.