

梅花鹿 3 个种群遗传多样性的微卫星标记分析

孙海涛^① 李馨^{①*} 耿忠诚^① 杨隽^① 刘文峰^① 王忠武^② 黄淑元^②

(^①黑龙江八一农垦大学动物科技学院 大庆 163319; ^②黑龙江省兴凯湖农场鹿场 密山 158325)

摘要: 利用 16 个微卫星标记对黑龙江省部分地区(兴凯湖农场、大庆市银浪牧场、五大连池大庆农场鹿苑)的 3 个梅花鹿(*Cervus nippon*)群体进行了遗传多样性检测。统计了 3 个鹿群的等位基因组成、平均有效等位基因数(N_e)、平均遗传杂合度(h)和多态信息含量(PIC)。结果表明,除 5 个位点外,其余 11 个微卫星位点均表现出不同的多态信息含量,其中高度多态位点 5 个,中度多态位点 4 个。这说明本研究所选用的微卫星位点可较准确地评估 3 个梅花鹿群体的遗传多样性,并为今后相关研究筛选出了有价值的引物。3 个梅花鹿群体的平均 h 在 0.454~0.636 之间变动,其中兴凯湖梅花鹿群体最高,为 0.636,具有较大的遗传潜力。

关键词: 梅花鹿; 微卫星标记; 遗传多样性

中图分类号: Q825 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263(2009)03-30-06

Genetic Diversity in Three Sika Deer Populations as Revealed by Microsatellite Markers

SUN HaiTao^① LI Xin^{①*} GENG Zhong-Cheng^① YANG Jun^① LIU WengFeng^①
WANG ZhongWu^② HUANG ShuYuan^②

(^① College of Animal Science and Technology, Heilongjiang August First Land Reclamation University, Daqing 163319;

^②Xingkai Lake Farm of Heilongjiang Province, Mishan 158325, China)

Abstract: The genetic polymorphism of 16 microsatellite loci in three Sika Deer (*Cervus nippon*) populations in Heilongjiang Province (Xingkaihu farm in Mishan region, Yinlang livestock farm in Daqing region, and Daqing farm in Wudalianchi region) was determined. Number of alleles, effective number of alleles (N_e), mean heterozygosity (h) and polymorphism information content (PIC) were calculated for each population. The results showed that 11 of 16 microsatellite loci were polymorphic except for T501, C14, C217, T107 and C273. Among the 11 loci with polymorphism, five were highly polymorphic and four were medium polymorphic, showing that these microsatellite loci are effective markers for the genetic analysis of *C. nippon* populations. The average heterozygosity of the three groups changed from 0.453 to 0.636 and Xingkaihu Group had the highest h (0.636), which could have more potential for selection.

Key words: Sika Deer (*Cervus nippon*); Microsatellite markers; Genetic diversity

我国的梅花鹿(*Cervus nippon*)资源比较丰富,人工养殖量占鹿类养殖总量的 3/4,约 35 万头。在人工选择和定向培育过程中,梅花鹿体型变大,通过多年人工饲养和科研人员的努力,我国已成功培育出遗传性能稳定的敖东梅花鹿、四平梅花鹿、东丰梅花鹿、兴凯湖梅花鹿、双

基金项目 黑龙江农垦总局资助项目(No. HNKXIV-08-12D),
校博士基金资助项目;

* 通讯作者, E-mail: lixin3657@sina.com;

第一作者介绍 孙海涛,男,硕士研究生;研究方向:动物种质
资源开发与利用; E-mail: sht626@yahoo.com.cn.

收稿日期:2008-11-19, 修回日期:2009-03-04

阳梅花鹿、西丰梅花鹿和长白山梅花鹿。其中, 兴凯湖梅花鹿是黑龙江省在 2003 年自主培育而成的一个梅花鹿新品种^[1]。

微卫星 DNA 又称为简单重复序列 (simple sequence repeat, SSR), 是继 RFLP、RAPD 和 AFLP 等分子标记之后, 发展起来的又一分子标记技术。微卫星 DNA 由于具有分布广泛、多态性丰富、易于检测、进化所受选择压力小等特点, 在度量品种遗传多样性及构建系统发生树等研究中显示出巨大的优势, 被认为是各类遗传标记中最有价值的一种。国外已广泛开展了对马鹿 (*C. elaphus*)、梅花鹿等的微卫星研究。Polziehn 等^[2] 分析了北美 11 个马鹿群体在 12 个微卫星位点上的遗传多样性, 发现北美马鹿群体中平均每个位点上有 3~4 个等位基因, 平均杂合度在 0.26~0.53 之间。Leite 等^[3] 利用 38 个微卫星标记对巴西濒危的南美泽鹿 (*Blastocerus dichotomus*) 群体的 15 个个体进行了遗传多样性检测, 为品种保护提出了建议。Tamate 等^[4] 在对日本的梅花鹿进行微卫星研究时发现, 尽管群体数量很小, 但其鹿群仍保留着丰富的遗传多样性。Thevenon 等^[5] 对越南梅花鹿 (*C. nippon pseudaxis*) 在 9 个位点上进行微卫星多样性的检测, 结果发现, 尽管种群受到了近交的影响, 但仍然具有丰富的多样性。近年来, 国内学者利用微卫星标记技术对鹿科动物也开展了一些研究。张苏云等^[6] 利用 5 个微卫星位点对新疆塔里木马鹿的 3 个群体进行了遗传多样性分析, 认为塔里木马鹿遗传变异度较高, 遗传多样性相对丰富, 具有较大的遗传潜力。吴华等^[7] 利用 16 个微卫星位点对我国 4 个野生梅花鹿种群的遗传多样性进行了分析, 并探讨了我国野生梅花鹿的保护和管理对策。邢秀梅* 利用 20 个微卫星标记对 9 个梅花鹿、马鹿品种和类型进行了 DNA 多态性测定, 并进行了分类, 结果与中国茸鹿的地理分布基本一致。

尽管国内外学者对鹿已经开展了关于品种或种群遗传多样性分析, 但是针对黑龙江省梅花鹿群体的研究报道比较少。而黑龙江省饲养梅花鹿数量多、鹿茸质量好, 特别是兴凯湖梅花

鹿尤为突出。因此, 本研究利用 16 个微卫星标记对黑龙江省 3 个梅花鹿群体进行了遗传多样性的分析, 以期对黑龙江省梅花鹿种质资源的保护和开发与利用及遗传育种工作提供分子理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样本采集 实验所用梅花鹿均为圈养群体, 血样采自兴凯湖鹿场 (X, $n=120$)、大庆市银浪牧场 (YL, $n=16$)、五大连池大庆农场鹿苑 (WD, $n=63$), 锯茸期每只个体采血 6 ml, ACD 抗凝处理, -20°C 冻存, 用于基因组 DNA 提取。

1.1.2 主要仪器设备 PCR 扩增仪 (GeneAmp PCR System 9700)、稳压稳流电泳仪 (DYY-10C)、垂直板电泳仪 (DYY-III5)、电泳槽 (DYCZ-24B)。

1.1.3 主要试剂 *Taq* 酶, $10\times$ bufer, dNTP, 20 bp DNA Ladder Marker 均购自大连宝生物工程有限公司。

1.1.4 微卫星引物 实验所用的扩增引物是通过查阅相关的文献资料^[2,8,9] 和 GenBank 公开发表的 24 对微卫星引物。由上海生工生物技术有限公司合成。经 PCR 扩增筛选后保留效果较好的 16 对引物 (表 1)。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取 按分子克隆^[10] 中血液 DNA 的提取方法提取样品血液的基因组 DNA, 并根据实验作进一步的改动。所得 DNA 样品加入 25 μl TE (pH=8.0) 溶解过夜, -20°C 保存备用。

1.2.2 PCR 扩增 PCR 反应体系为 25 μl , 其中模板 DNA 30~50 ng, $10\times$ bufer 2.5 μl (25 mmol/L), dNTP 2 μl (2 mmol/L), 引物 1 μl (25 pmol/L), *Taq* 酶 0.5 μl (2 U/ μl), ddH₂O 补足至 25 μl 。PCR 反应条件为: 94°C 预变性 5 min;

* 邢秀梅, 中国茸鹿分子遗传多样性研究, 吉林长春: 中国农业科学院特产所, 2006。

94℃变性 30 s, 48~ 59℃复性 30 s(因引物而异), 72℃延伸 30 s; 最后 72℃延伸 10 min。

表 1 微卫星引物序列

Table 1 Primer sequences of microsatellite loci

微卫星位点 Loci	引物序列 Primer sequence	片段长度 Sequence length (bp)	等位基因数 Number of Alleles
T156	F: TCITCCTGACCTGTGTCTG R: GATGAATACCCAGTCTTGTCTG	180~ 140	9
T530	F: GTCCTCACAGCAGCTCTATG R: GCATTCTTTAGAACTCCAACCTG	288~ 236	7
T123	F: GTTTCCTTGGCACATCTCT R: CTGTCTGTTGTTTCTGTGTG	187~ 119	13
T507	F: AGGCAGATGCTTCACCATC R: TGTGGAGCACCTCACACAT	171~ 142	5
T501	F: CTCCTCATTATTA CCCTGTGAA R: ACATGCTTTGACCAAGACC	250	1
C180	F: GGTGGGCATTGAGTGA R: AGGCAGAGAAGGCATTG	147~ 133	3
C143	F: AAGGAGTCTTTGAGTTTGA R: GGTTCTGCTTTGCTTGTG	170	1
C217	F: GCAGGAAGGAGGAGACAGTA R: GCTGCTTCGTTATCATTTAGC	190	1
BM 1225	F: TTTCTCAACAGAGGTGTCCAC R: ACCCCTATCACCATGCTCTG	300~ 245	5
BM 1706	F: ACAGGACGGTTTCTCCTTATG R: CTTGCAGTTTCCCATACAAGG	252~ 226	4
BM 203	F: GGGTGTGACATTTTGTTCCTC R: CTGCTCGCCACTAGTCCCTC	266~ 220	4
CERVID14	F: AAAAAAAGACTCTCCGGAAGG R: TGGACATGCAGAACCTACCA	60~ 50	3
T107	F: CGCAAGCAATTAATGTGAGTTA R: AATCATGGTCAATAGCTGTTTCTG	133	1
T172	F: CGCAAGCAATTAATGTGAGTTA R: AATCATGGTCAATAGCTGTTTCTG	137~ 135	2
T108	F: AGTTGAGACAGCAGCTGAC R: TTCAAGCGATTCTCCTCC	160~ 140	2
C273	F: TCACTGCAACCTCTGCTCTC R: TGTAGTCCAGCTACTCGGG	70	1

1.2.3 电泳及基因型判定 12% 非变性聚丙烯酰胺凝胶, 100 V 电泳过夜, 银染法显色^[11], 数码相机照相, Gel-Pro 4.5 (E) DNA 与蛋白质分析软件判读等位基因扩增片段的大小。扩增带 1 条的为纯合子, 扩增带 2 条的为杂合子。

1.2.4 数据统计及分析 利用 POPGEN 3.2 软件计算各微卫星基因座的遗传多样性参数, 即等位基因频率(P)、遗传杂合度(heterozygosity, h) 以及有效等位基因数(effective number of alleles, N_e); SAS 软件计算多态性信息含量(polymorphism information content, PIC)。

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2P_i P_j^2,$$

$$h = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2,$$

$$N_e = 1 / \sum_{i=1}^n P_i^2$$

其中, P_i 和 P_j 分别为第 i 和第 j 个等位基因的频率, n 为等位基因个数。

2 结果

2.1 聚丙烯酰胺凝胶电泳结果 部分微卫星位点的凝胶电泳结果见图 1、图 2。

2.2 等位基因组成 在本研究所选用的 16 个微卫星位点中, 除了 T501、C143、C217、T107 和 C273 5 个为单态位点之外, 其他位点都表现出了不同程度的多态性。各微卫星等位基因数为 2~ 13 个。

2.3 梅花鹿群体遗传特性 根据等位基因频率计算了 3 个群体在 11 个多态微卫星位点的多态性信息含量(PIC), 有效等位基因数(N_e) 和平均杂合度(h)。同时计算了 3 个群体全部位点的平均 PIC、 N_e 和 h 的值, 结果见表 2。

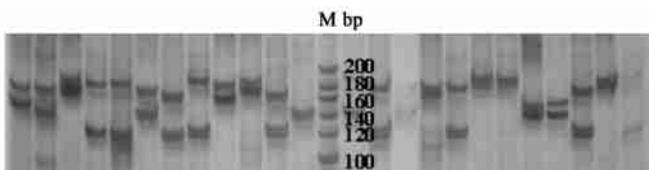


图 1 部分兴凯湖个体在 T123 位点扩增产物的电泳结果

Fig. 1 Electrophoresis patterns of microsatellite locus amplified by primer T123 in several Xingkaihu individuals

M, 20 bp DNA 分子量标准。M, 20 bp DNA ladder marker.

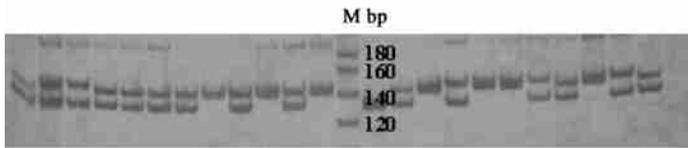


图 2 部分兴凯湖个体在 C180 位点扩增产物的电泳结果

Fig. 2 Electrophoresis patterns of microsatellite locus amplified by primer C180 in several Xingkaihu individuals

M. 20 bp DNA 分子量标准。M. 20 bp DNA ladder marker.

表 2 3 个梅花鹿群体在 11 个微卫星位点的遗传特性

Table 2 Genetic characteristics of eleven microsatellite loci in three *Cervus nippon* populations

微卫星位点 Loci	群体 Population	等位基因数(A) The numbers of alleles	有效等位基因(Ne) Effective number of alleles	平均杂合度(h) Average of heterozygosity	多态性信息含量(PIC) Polymorphism information content
T156	X	7	4.899	0.796	0.766
	WD	6	5.172	0.807	0.778
	YL	7	5.556	0.820	0.924
	平均值 Average	6.7	5.209	0.808	0.823
T530	X	5	3.847	0.740	0.697
	WD	4	3.045	0.672	0.608
	YL	2	1.133	0.117	0.110
	平均值 Average	3.7	2.675	0.510	0.472
T123	X	6	3.679	0.728	0.685
	WD	7	4.768	0.790	0.761
	YL	7	5.370	0.814	0.761
	平均值 Average	6.7	4.605	0.777	0.736
T507	X	4	2.293	0.564	0.523
	WD	4	2.133	0.531	0.491
	YL	4	1.950	0.487	0.438
	平均值 Average	4	2.125	0.527	0.484
C180	X	3	2.778	0.640	0.569
	WD	2	1.990	0.497	0.374
	YL	2	1.882	0.469	0.359
	平均值 Average	2.3	2.217	0.535	0.434
BM1225	X	5	3.623	0.724	0.681
	WD	5	3.682	0.728	0.684
	YL	3	2.133	0.531	0.468
	平均值 Average	4.3	3.146	0.661	0.611
BM1706	X	4	2.899	0.655	0.595
	WD	4	2.741	0.635	0.569
	YL	4	2.305	0.566	0.484
	平均值 Average	4	2.648	0.619	0.549
BM203	X	4	3.533	0.717	0.665
	WD	4	3.200	0.688	0.630
	YL	4	3.200	0.688	0.630
	平均值 Average	4	3.311	0.697	0.642
CERVID14	X	3	2.038	0.509	0.401
	WD	2	1.663	0.399	0.319
	YL	1	1.000	0.000	0.000
	平均值 Average	2	1.567	0.303	0.240

续表 2

微卫星位点 Loci	群体 Population	等位基因数(<i>A</i>) The numbers of alleles	有效等位基因(<i>Ne</i>) Effective number of alleles	平均杂合度(<i>h</i>) Average of heterozygosity	多态性信息含量(PIC) Polymorphism information content
T172	X	2	1.862	0.427	0.356
	WD	1	1.000	0.000	0.000
	YL	1	1.000	0.000	0.000
	平均值	1.3	1.287	0.142	0.119
T108	X	2	2.000	0.500	0.375
	WD	2	2.000	0.500	0.375
	YL	2	2.000	0.500	0.375
	平均值 Average	2	2.000	0.500	0.375
各群体平均值	X	4.1	3.041	0.636	0.574
Average of all populations	WD	3.7	2.854	0.568	0.508
	YL	3.4	2.503	0.454	0.414
全部位点平均值 Average of all loci		3.7	2.799	0.553	0.499

X. 兴凯湖群体; WD. 五大连池群体; YL. 银浪群体。

X. Xingkaihu population; WD. Wudalianchi population; YL. Yinlang population.

3 讨论

3.1 微卫星位点的选择 根据其他研究者的实验结果,笔者选用了 24 个扩增效果好且条带多的微卫星标记位点进行实验,但在本实验中其位点的多态性与源引文献^[2,6]中的结果并不一致。Polziehn 等^[2]研究了 11 个马鹿群体在 12 个微卫星位点上的多态性,在研究中发现 BM4513 共有 12 个等位基因;张苏云等^[6]在新疆 3 个马鹿群体中得到 BM888 位点的 5 个等位基因,但在本实验中这两个位点(BM4513, BM888)经 PCR 扩增都无法优化得到扩增条带。笔者认为这种差异可能是由于马鹿与梅花鹿种属不同所产生的。本研究共筛选出 16 个扩增效果清晰的位点:11 个多态位点(平均等位基因数在 1.3~ 6.7 之间)和 5 个单态位点,共测得 62 个等位基因。尹君^[8]对马鹿微卫星研究中等位基因较多的 4 个位点在本研究中也检测出了较多个等位基因,这又进一步说明了尽管动物种属间存在差异,但是微卫星位点在种属间的“借用”^[12]是可行的。

多态信息含量(PIC)是衡量片段多态性的较好指标。Botstein 等^[13]首先提出了衡量基因变异程度高低的多态信息含量指标,当 $PIC >$

0.5 时,该位点为高度多态性位点,具有高度的可提供信息性;当 $0.25 < PIC < 0.5$ 时,为中度多态性位点,标记能够提供较合理的信息;当 $PIC < 0.25$ 时,为低度多态性位点,标记可提供的信息较差。在本实验结果中,16 个受测微卫星位点中,除了 T501、C143、C217、T107、C273 5 个单态位点外,其余的 11 个位点均表现出不同的多态信息含量,其中 T156、T123、BM1225、BM1706 和 BM203 平均 PIC 在 0.549 以上,为高度多态位点;T530、T507、C180、T108 平均 PIC 在 0.375~ 0.484 之间,为中度多态位点;T172 和 CERVID14 平均 PIC 在 0.24 以下,为低度多态位点。实验结果表明,本研究所选用的 11 个微卫星位点可作为有效的分子遗传标记用于 3 个梅花鹿群体的遗传分析,能够较好地反映群体的遗传多样性。

3.2 3 个梅花鹿群体遗传多样性评估 群体的平均杂合度是度量品种变异的一个最适参数^[7],表示被检测的位点上群体中杂合子的频率,它既是群体杂合程度的度量单位,也是被检测的遗传标记多态性的度量单位。平均杂合度的高低近似地反映出群体遗传结构和变异程度的高低。本研究中 3 个群体的平均遗传杂合度为 0.553,这与吴华等^[7]对中国梅花鹿所做的微

卫星研究结果 ($h = 0.559$) 一致, 高于日本的梅花鹿 ($h = 0.525$)^[4], 略低于越南的梅花鹿 ($h = 0.57$)^[5]。这说明黑龙江省梅花鹿的微卫星多态性并不缺乏^[7], 处于濒危动物遗传多样性的中间水平。

多态信息含量和杂合度都是表示标记多态性程度的统计量, 邢秀梅* 通过实验验证了二者之间有着高度的相关性。本实验中, 11 个微卫星位点在 3 个群体中平均多态信息含量分别为兴凯湖梅花鹿群体 0.574、五大连池鹿群 0.508、银浪牧场鹿群 0.414。这也进一步证明了 3 个检测群体均具有很高的多态信息含量, 具有较高的遗传潜力。

本实验结果表明, 兴凯湖梅花鹿群体的遗传杂合度 (0.636) 最高, 高出中国梅花鹿的平均 h (0.559)^[7]。作为人工培育品种的保种群体, 这与它的选育背景及饲养管理方式有着密切关系。兴凯湖梅花鹿^[1] 源于前俄国 1871 年在远东地区捕获的 15 只乌苏里梅花鹿 (*C. h. hortulorum*), 从 1976 年起经历了 28 年连续 4 个世代系统选育而成, 国外引种的乌苏里梅花鹿, 为兴凯湖梅花鹿这一品种基因的广泛来源奠定了基础。其次, 饲养位置位于兴凯湖国家级自然保护区, 森林湿地草原地带为其放牧饲养方式提供条件, 大群体的自然交配也使低频率等位基因不易丢失, 构成了兴凯湖梅花鹿高度的基因多样性。兴凯湖梅花鹿品种独特而优秀的遗传资源, 对今后该品种的继续优良选育提供了丰富的遗传资源, 也能为梅花鹿不同品种(品系)间的生产性能与遗传结构的改良提供优秀种源。

致谢 感谢兴凯湖农场鹿场王忠武场长在实验材料采集和育种资料搜集过程中提供的方便条件及大力支持。

参 考 文 献

- [1] 王忠武, 马生良, 李海等. 兴凯湖梅花鹿品种选育研究. 经济动物学报, 2004, 8(1): 1~ 6.
- [2] Polzieln R O, Hamr J, Mallory F F, et al. Microsatellite analysis of North American wapiti (*Cervuelaphus*) populations. *Molecular Ecology*, 2000, 9(10): 1 561~ 1 576
- [3] Leite K C E, Collevatti R G, Menegasso T R, et al. Transferability of microsatellite loci from Cervidae species to the endangered Brazilian marsh deer, *Blastocerus dichotomus*. *Genetics and Molecular Research*, 2007, 6(2): 325~ 330.
- [4] Tamate H B, Okada A, Minami M, et al. Genetic variations revealed by microsatellite markers in a small population of the Sika Deer (*Cervus nippon*) on Kinkazan Island, Northern Japan. *Zoological Science*, 2000, 17: 47~ 53
- [5] Thévenon S, Thuy L T, Ly L V, et al. Microsatellite analysis of genetic diversity of the Vietnaese Sika Deer (*Cervus nippon pseudaxis*). *Journal of Heredity*, 2004, 95(1): 11~ 18.
- [6] 张苏云, 钟林, 贾斌等. 新疆塔里木马鹿遗传多样性的微卫星分析. 畜牧与兽医, 2006, 38(11): 17~ 20
- [7] 吴华, 胡杰, 万秋红等. 梅花鹿的微卫星多态性及种群的遗传结构. 兽类学报, 2008, 28(2): 109~ 116.
- [8] 尹君, 张明海, 谢绪昌. STR 在野生东北马鹿个体识别中的应用. 野生动物, 2007, 28(3): 42~ 44.
- [9] Deyoung R W, Demarais S, Honeycutt R L, et al. Genetic consequences of whitetailed deer (*Odocoileus virginianus*) restoration in Mississippi. *Molecular Ecology*, 2003, 12: 3 237 ~ 3 252.
- [10] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 编著. 分子克隆实验指南(第三版). 北京: 科学出版社, 2002.
- [11] 石锐, 郭长虹. 聚丙烯酰胺凝胶中 DNA 的银染方法. 生物技术, 1998, 8(5): 46~ 48
- [12] XU Y, PAN Z, XU Z. Status of microsatellites as genetic markers in cervids. *Journal of Forestry Research*, 2001, 12(1): 55~ 58.
- [13] 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: 314~ 331.

* 邢秀梅. 中国茸鹿分子遗传多样性研究. 吉林长春: 中国农业科学院特产所, 2006.