

基于非损伤取样法的林麝微卫星遗传多样性分析

王喆^① 闫利平^① 鲁冠杰^① 高云云^① 何伦^②
李明哲^② 胡德夫^① 张东^{①*}

① 北京林业大学生态与自然保护学院 北京 100083; ② 中国野生动物保护协会 北京 100714

摘要: 林麝 (*Moschus berezovskii*) 为我国一级重点保护野生动物, 为了保护野生林麝种群、满足中医药等行业对天然麝香的需求, 我国从 20 世纪 50 年代开始人工饲养林麝。维持高的遗传多样性是实现饲养林麝种群可持续增长并放归野外的关键因素。本研究旨在筛选可用于粪便 DNA 扩增的林麝四碱基微卫星位点, 并评估陕西凤县 2 个饲养林麝种群的遗传多样性。通过搜集文献, 共获得 25 个林麝四碱基微卫星位点, 其中 19 个可从粪便 DNA 中稳定扩增, 且基因分型峰型较好, 能用于后续分析, 与前人研究相比增加了 13 个粪便 DNA 微卫星位点。利用 19 个微卫星位点, 对陕西凤县富民和海兴 2 个饲养林麝种群共计 95 只林麝进行遗传多样性分析, 其中 7 个位点多态信息含量超过 0.5, 为高多态性位点, 10 个位点符合哈迪-温伯格平衡 ($P > 0.05$)。本研究中的 95 只林麝共存在 99 个等位基因, 有效等位基因总数为 43.880 5, 平均 Shannon's 信息指数为 0.930 6, 平均多态信息含量为 0.428 3, 表明陕西饲养林麝种群具有较高的遗传多样性。平均观测杂合度为 0.449 4, 平均期望杂合度为 0.467 5, 观测杂合度低于期望杂合度, 种群存在近交的趋势。富民麝场饲养林麝遗传多样性高于海兴麝场, 2 个种群的遗传分化较小, 有较大的基因流, 所有林麝个体共来源于 4 个基因簇, 富民麝场的林麝主要来自于 1 和 2 基因簇, 海兴麝场的林麝主要来自于 3 和 4 基因簇。

关键词: 林麝; 非损伤取样法; 粪便 DNA; 微卫星; 遗传多样性

中图分类号: Q953 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2024) 03-408-10

Microsatellite Genetic Diversity Analysis of Forest Musk Deer *Moschus berezovskii* Based on Noninvasive Sampling Technology

WANG Zhe^① YAN Li-Ping^① LU Guan-Jie^① GAO Yun-Yun^① HE Lun^②
LI Ming-Zhe^② HU De-Fu^① ZHANG Dong^{①*}

① School of Ecology and Nature Conservation, Beijing Forestry University, Beijing 100083;

② China Wildlife Conservation Association, Beijing 100714, China

基金项目 国家林业和草原局应急揭榜挂帅项目 (No. 202303), 国家林业和草原局重点研发项目 (No. GLM (2021) 45), 漳州片仔癀药业股份有限公司委托项目 (No. YC-20018), 北京林业大学杰出青年人才培育计划项目 (No. 2019JQ0318);

* 通讯作者, E-mail: zhangdong_bjfu@bjfu.edu.cn;

第一作者介绍 王喆, 女, 硕士研究生; 研究方向: 野生动植物保护与利用; E-mail: wzhe0314@163.com。

收稿日期: 2023-05-17, 修回日期: 2023-12-27 DOI: 10.13859/j.cjz.202423095

Abstract: [Objectives] Forest Musk Deer *Moschus berezovskii* is first class protection wildlife in China. In order to protect the wild Forest Musk Deer population and meet the demand for natural musk in traditional Chinese medicine and other industries, China began to raise Forest Musk Deer artificially in the 1950s. Maintaining high genetic diversity of the population is the key factor to realize the sustainable growth and release of the captive Forest Musk Deer population into the wild. **[Methods]** In Fengxian County, Shaanxi Province, we collected feces samples from 95 Forest Musk Deer in two captive populations and kept all the samples in a lab refrigerator at -20 °C until DNA extraction. We selected published tetranucleotide microsatellite loci, then identified microsatellite loci that can be reliably amplified from fecal DNA. The forward primers of these loci were colored with fluorescent dyes and used to analyze the genetic diversity of 95 captive Forest Musk Deer. **[Results]** Twenty-five tetranucleotide microsatellite loci of Forest Musk Deer were obtained, of which 21 could be steadily amplified from fecal DNA, and two of them had chaotic peaks that were not suitable for analysis (Appendix 1). For the 19 microsatellite loci, there were 7 loci with polymorphism information content > 0.5, which were high polymorphism loci, and 10 loci were consistent with Hardy-Weinberg equilibrium ($P > 0.05$) (Table 1). Among the two populations studied, 95 individuals had 99 alleles and 43.880 5 effective alleles, the mean of Shannon's index and polymorphism richness were 0.930 6 and 0.428 3 respectively. The mean observed heterozygosity was 0.449 4, and the mean expected heterozygosity was 0.467 5. The genetic diversity of the Fumin farm population was higher than that of the Haixing farm (Table 3). All the Forest Musk Deer individuals came from four gene clusters. The Forest Musk Deer of the Fumin farm mainly came from gene cluster 1 and 2, and the Forest Musk Deer of the Haixing farm mainly came from gene cluster 3 and 4 (Fig. 2). **[Conclusion]** The selected microsatellite loci were 13 more than the previous studies, which can provide a reference for future studies on genetic diversity of Forest Musk Deer based on fecal samples. The captive Forest Musk Deer in Fengxian County, Shaanxi Province showed high genetic diversity but a tendency to inbreed. The genetic differentiation of Fumin Forest Musk Deer farm and Haixing Forest Musk Deer farm was small, and there was a large gene flow. It is suggested that the provenance of each captive population can be changed to increase the degree of heterozygosity.

Key words: Forest Musk Deer, *Moschus berezovskii*; Noninvasive sampling technology; Fecal DNA; Microsatellite; Genetic diversity

林麝 (*Moschus berezovskii*) 是东亚特有的反刍动物, 以其成年雄性分泌的麝香而闻名(吴家炎 2006), 被 IUCN 列为濒危物种。林麝资源的保护不仅关乎我国传统中医药学的发展, 更是我国生态文明建设的重要体现 (Ma et al. 2022)。为了防止野生林麝种群灭绝, 我国从 1958 年起开始人工饲养林麝 (盛和林 2007)。目前, 我国在饲养林麝方面已取得了显著性的成果, 林麝养殖产业呈现快速稳步增长趋势。据 2020 年调研统计数据, 我国人工饲养麝类数量已超过 3 万只, 其中绝大部分为林麝, 年产

麝香约 100 kg (郑程莉等 2022)。据估计, 我国天然麝香每年使用需求大约 1 000 kg, 麝香仍极度供不应求, 林麝养殖正处于扩大规模的关键时期 (Feng et al. 2023)。

遗传多样性的形成过程是通过一个物种进化过程中遗传物质的变异和聚集而产生的 (Ellegren et al. 2016, Leigh et al. 2019, De Woody et al. 2021)。物种的遗传多样性越丰富, 其进化潜力越大, 从而增强其应对环境变化的能力 (Forest et al. 2007, Pauls et al. 2013)。由于饲养林麝的谱系缺失或不清楚, 并且在繁育

过程中饲养员通常会考虑林麝个体的驯化程度、身体状况、繁殖能力和泌香量等指标,致使林麝在小种群内繁殖,甚至近亲交配(竭航等 2015, Gauffre et al. 2022),部分不利的隐性基因会逐渐暴露,出现个体生病、畸形甚至死亡等情况(Robinson et al. 2023)。同时,由于基因多样性降低,使其缺乏进化潜力,无法应对未来多变的环境,林麝种群可能走向衰落(Yousefi et al. 2022, Yang et al. 2023)。濒危物种保护的成功案例,不仅要保护其种群数量,而且还要保护其遗传多样性,以保证物种的长期生存(Laikre et al. 2020, Hu et al. 2021)。

为了保护林麝的遗传多样性,科研工作者们进行了诸多研究与探索。关于饲养林麝与野生林麝的遗传多样性比较,由于取样类群的差异,不同研究中饲养种群遗传多样性与野生种群多样性高低不一致(张立锋 2004, 胡大明等 2021)。Cai 等(2020)采集了 5 个世代的饲养林麝样品,探究轮流繁殖管理系统是否能有效减缓遗传多样性丧失,结果显示该繁殖管理系统能使林麝保持较高的遗传多样性。唐婕等(2021)使用 NET Framework 框架设计 B/S 架构的林麝管理平台,以实现饲养林麝资源的信息化管理。曹新芳等(2022)利用微卫星标记构建了林麝核心种质资源库,为饲养林麝繁育提供基础数据支撑。明确饲养林麝种群的遗传状况将有助于更好地保护其遗传多样性(Ahmad et al. 2016, Yang et al. 2022),DNA 分子标记技术被广泛运用到遗传多样性的研究中,拥有巨大的应用潜力(Frankham 2010)。

微卫星为共显性分子标记,符合孟德尔定律,广泛分布在基因组中,多态性高,是评估种群遗传多样性最常用的标记之一(Salipante et al. 2014)。高通量测序技术的出现,使以更低的成本在非模式物种中鉴定大量的微卫星位点成为可能(Di Rienzo et al. 1994)。Qi 等(2020)利用高通量测序技术对林麝基因组进行测序,从林麝基因组中扫描搜索微卫星序列,共搜索到 680 635 个完美型微卫星位点。魏浩

(2020)使用转录组测序技术,对林麝骨髓细胞进行测序,获得 5 777 个微卫星位点。与二碱基、三碱基微卫星位点相比,四碱基微卫星位点在 PCR 过程中不易出现滑带或阴影带,基因分型结果更精确(Guichoux et al. 2011)。目前已有较多关于林麝微卫星的遗传多样性研究,但前人研究中使用粪便 DNA 扩增的四碱基微卫星位点较少。本研究首先通过前人文献获得林麝四碱基微卫星位点,再用粪便 DNA 样本扩增,得到可用于非损伤研究的微卫星位点,并对“中国林麝之乡”陕西凤县 2 个具有代表性的麝场进行遗传多样性分析,为林麝繁育的一线工作提供基础资料与科学依据,加快我国饲养林麝的扩繁以及野生林麝的种群恢复。

1 材料与方法

1.1 实验材料

凤县隶属陕西省宝鸡市,北依秦岭、南接紫柏山,属暖温带山地气候,2017 年,被国家林业局野生动物保护协会授予“中国林麝之乡”的荣誉称号。富民麝场(33°45'08" N, 106°33'09" E, 海拔 1 132 m)是凤县最早建立的麝场;海兴麝场(33°43'25" N, 106°34'58" E, 海拔 1 222 m)为凤县养殖规模较大的麝场。2 个麝场均辐射带动多家养殖户,养殖模式类似,以人工饲养为主,繁殖期间按 4 : 1 的雌雄比进行配种。

在富民麝场和海兴麝场分别随机采集 42 份和 53 份林麝粪便样品,每日清晨 5:00 至 6:00 时采集新鲜的粪便,装入无菌自封袋中。所有样品均标记林麝的耳号、性别,以及采样地点和时间,使用移动冰箱运回实验室后置于 - 20 °C 冰箱保存备用,并尽快完成 DNA 提取。

1.2 实验方法

1.2.1 DNA 提取及 PCR 扩增 参照唐婕等(2018)的方法,将粪便样品处理为细胞悬液,再进行后续的 DNA 提取。取约 0.5 g 林麝粪便(约 5 粒粪便)样品于 15 ml 离心管中,加

入 3 ml PBS 缓冲液, 静置 1~3 min, 使用漩涡震荡仪剧烈震荡 30~45 s, 吸出全部液体于新的 15 ml 离心管, 2 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 再用 0.2 ml PBS 缓冲液将沉淀重悬浮, 吸出后置于 1.5 ml 离心管中, 此时已将粪便样品表面的肠道上皮细胞处理成细胞悬浮液。使用血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司]提取林麝基因组 DNA。25 个已发表林麝四碱基微卫星位点见附录 1。

首先于北京擎科生物科技股份有限公司合成普通引物, 使用从粪便样品提取的 DNA 进行 PCR 扩增, 再使用羧基荧光素 (carboxy fluorescein, FAM) 与六氯荧光素 (hexachloro fluorescein, HEX) 将可以成功扩增的引物在正向的 5'端加上荧光修饰。不同荧光样品可进行混样测序。荧光引物用锡箔纸包裹, 操作时避光处理, 避免荧光降解。

PCR 反应体系为 25 μ l: DNA 模板 30~50 ng, 10 μ mol/L 的正、反引物各 1 μ l, 2 \times Es Taq Master Mix 12.5 μ l。反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 循环 35 次; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

将 PCR 产物与上样缓冲液 (loading buffer) 混合, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 目的片段约为 200~300 bp, 出现与目的片段大小相符条带的为合格样品, 送往北京擎科生物科技股份有限公司进行基因分型。

1.2.2 数据分析 以 LIZ-500 为标准内参, 使用 Gene Mapper 4.0 (Applied Biosystems, CA, 美国) 对毛细管电泳数据进行分析, 选择信号值高于 400 bp、无杂峰、同一位点峰型相似的数据, 构建原始数据矩阵; 使用 POPGENE 1.31 (Yeh et al. 1998) 计算遗传多样性参数、近交系数、遗传分化系数 F_{st} 、Nei's 遗传距离及遗传同一性。基因流 (N_m) 根据 $N_m = 0.25 (1 - F_{st}) / F_{st}$ 计算。根据 Nei's 遗传距离进行主坐标分析 (principal coordinate analysis, PCoA); 应用 GENALEX 6 (Peakall et al. 2010) 进行哈迪-

温伯格平衡 (Hardy-Weinberg equilibrium, HWE) 检验和分子方差分析 (analysis of molecular variance, AMOVA)。使用 Structure 2.3.3 (Pritchard et al. 2000) 软件基于马尔科夫链蒙特卡洛 (Markov chain Monte Carlo, MCMC) 法分析种群遗传结构, 设基因簇数量为 K , 范围为 1~10, 每个 K 值独立运行 10 次, 每个循环的重复抽样次数设置为 100 000 次, 在 Structure Harvester (Earl et al. 2012) 网站中计算最适 K 值。对 2 个麝场的遗传参数进行独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 代表差异性显著, $P < 0.01$ 代表差异性极显著。

2 结果

2.1 微卫星位点多态性分析

已发表的 25 个位点中, 有 21 个可用于粪便样品基因组 DNA 扩增 (附录 1), 将 21 个位点合成荧光引物, 进行 PCR 扩增及基因分型。每个位点分型结果使用 Gene mapper 4.0 进行分析并导出数据, 位点 LS-2-1 和 Mb16 由于峰型杂乱 (图 1), 未进行标记。

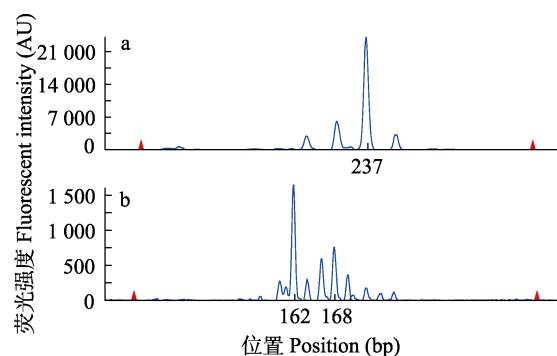


图 1 微卫星位点峰图

Fig. 1 Peaks plots of microsatellite loci

a. 位点 LS-2-1; b. 位点 Mb16. a. Locus LS-2-1; b. Locus Mb16.

其余 19 个位点在 95 个样本个体中共检测出 99 个等位基因位点, 有效等位基因总数为 43.880 5, Shannon's 信息指数平均值为 0.930 6, 多态信息含量的平均值为 0.428 3, 其中有 7 个高度多态性位点 (多态信息含量超过 0.5), 6

个中度多态性位点（多态信息含量为 0.25 ~ 0.50）和 6 个低度多态性位点（多态信息含量低于 0.25）。观测杂合度和期望杂合度均值分别为 0.449 4 和 0.467 5。符合哈温平衡的位点 ($P > 0.05$) 有 10 个, 显著偏离哈温平衡的位点 ($0.01 < P < 0.05$) 有 1 个, 极显著偏离哈温平衡的位点 ($P < 0.01$) 有 8 个 (表 1)。种群内近交系数平均值为 0.015 9, 总近交系数平均值为 0.033 1, 遗传分化系数平均值为 0.017 6, 基因流平均值为 13.991 4 (表 2)。

2.2 种群遗传多样性比较

富民麝场所饲养林麝的等位基因数、有效等位基因数、Shannon's 信息指数、观测杂合度和期望杂合度均高于海兴麝场饲养的林麝, 且差异性显著 ($P < 0.05$)。富民麝场的种群内近

交系数低于海兴麝场, 其数值差异性不显著 ($P > 0.05$)。2 个麝场的有效等位基因数低于等位基因数, 观测杂合度均低于期望杂合度 (表 3)。

2.3 种群遗传分化分析

分子方差分析中, 种群内遗传变异占总变异的 96%, 种群间遗传变异仅占总变异的 4%。2 个种群的遗传分化系数为 0.044 0, $F_{st} < 0.05$, 基因流为 5.431 9, 表明 2 个种群为低度分化, 存在较大基因流。

2.4 种群遗传距离及遗传结构分析

在 Structure Harvester 中计算得到的基因簇数量 K 值为 4, 表明 2 个种群中有 4 个基因簇的存在。2 个种群存在基因渗入现象 (图 2), 富民麝场林麝的基因组成主要来源于基因簇 1 (0.243 2%) 和基因簇 2 (0.399 8%); 海兴麝

表 1 19 个微卫星位点的多态性

Table 1 Polymorphism of 19 microsatellite loci

位点 Locus	等位基因数 Number of allele (N_a)	有效等位基因数 Effective number of allele (N_e)	Shannon's 信息指数 Shannon's index (I)	多态信息含量 Polymorphism information content (PIC)	观测杂合度 Observed heterozygosity (H_o)	期望杂合度 Expected heterozygosity (H_e)	哈迪-温伯格平衡 Hardy-Weinberg equilibrium (HWE)
LS-6-1	5	1.653 9	0.785 6	0.365 0	0.361 7	0.397 5	0.690 9
LS-7-1	3	1.272 3	0.390 7	0.193 3	0.157 9	0.215 1	0.044 7
LS-8-1	7	4.712 5	1.645 6	0.755 5	0.797 9	0.792 0	0.857 7
LS-9-1	5	1.229 0	0.440 0	0.180 4	0.178 9	0.187 3	0.000 0
LS-13-1	9	4.225 7	1.671 5	0.728 9	0.565 2	0.767 5	0.000 0
LS-14-2	11	5.285 5	1.933 3	0.788 9	0.884 2	0.815 1	0.509 9
LS-16-1	6	2.421 8	1.183 9	0.544 7	0.670 2	0.590 2	0.234 4
LS-18-1	3	1.787 5	0.769 6	0.391 7	0.473 7	0.442 9	0.466 7
LS-24-1	5	2.392 9	1.027 3	0.496 9	0.610 5	0.585 2	0.695 4
LS-27-1	6	1.321 1	0.572 2	0.235 2	0.234 0	0.244 3	0.001 1
LS-28-1	2	1.194 7	0.301 3	0.149 7	0.178 9	0.163 8	0.353 9
LS-29-1	8	3.026 5	1.465 2	0.638 4	0.600 0	0.673 1	0.000 0
LS-30-1	5	2.006 0	0.952 1	0.460 0	0.263 2	0.504 1	0.000 0
LS-31-1	2	1.489 9	0.510 6	0.274 7	0.351 1	0.330 6	0.543 7
LS-35-1	3	1.296 7	0.453 7	0.213 4	0.212 8	0.230 1	0.444 6
LS-47-1	6	2.431 5	1.076 1	0.509 1	0.627 7	0.591 9	0.000 0
LS-50-1	6	3.018 9	1.289 9	0.622 1	0.694 7	0.672 3	0.000 0
LS-56-1	4	1.829 0	0.759 5	0.379 6	0.431 6	0.455 6	0.000 0
21353	3	1.285 1	0.453 4	0.209 7	0.244 7	0.223 1	0.628 3
平均 Mean	5.210 5	2.309 5	0.930 6	0.428 3	0.449 4	0.467 5	0.288 0

表 2 19 个微卫星位点的近交系数、遗传分化系数及基因流

Table 2 Inbreeding coefficient, genetic differentiation coefficient, and gene flow of 19 microsatellite loci

位点 Locus	种群内近交系数 Inbreeding coefficient in population (F_{is})	总近交系数 Total inbreeding coefficient (F_{it})	遗传分化系数 Genetic differentiation coefficient (F_{st})	基因流 Gene flow (N_m)
LS-6-1	0.076 6	0.083 4	0.007 3	33.926 0
LS-7-1	0.268 6	0.269 0	0.000 5	541.351 5
LS-8-1	- 0.021 8	- 0.004 8	0.016 6	14.767 6
LS-9-1	0.032 4	0.049 8	0.017 9	13.694 6
LS-13-1	0.240 2	0.261 3	0.027 8	8.727 7
LS-14-2	- 0.100 5	- 0.094 1	0.005 8	43.071 3
LS-16-1	- 0.166 1	- 0.140 8	0.021 6	11.309 4
LS-18-1	- 0.094 9	- 0.091 3	0.003 3	75.536 6
LS-24-1	- 0.064 4	- 0.056 8	0.007 1	34.884 6
LS-27-1	0.028 1	0.040 3	0.012 6	19.602 5
LS-28-1	- 0.125 6	- 0.091 6	0.030 2	8.027 1
LS-29-1	0.094 0	0.101 3	0.008 1	30.662 4
LS-30-1	0.492 6	0.500 2	0.014 9	16.503 5
LS-31-1	- 0.070 2	- 0.068 7	0.001 4	173.431 8
LS-35-1	0.047 6	0.047 8	0.000 2	1 000.000 0
LS-47-1	- 0.077 6	- 0.068 4	0.008 6	28.957 1
LS-50-1	- 0.084 8	- 0.040 0	0.041 3	5.800 7
LS-56-1	- 0.041 9	0.040 3	0.078 9	2.918 8
21353	- 0.114 2	- 0.106 3	0.007 1	34.873 4
平均 Mean	0.015 9	0.033 1	0.017 6	13.991 4

表 3 2 个饲养林麝种群的遗传多样性参数

Table 3 Genetic diversity parameters of two captive *Moschus berezovskii* populations

种群 Population	等位基因数 Number of allele (N_a)	有效等位基因数 Effective number of allele (N_e)	Shannon's 信息指数 Shannon's index (I')	观测杂合度 Observed heterozygosity (H_o)	期望杂合度 Expected heterozygosity (H_e)	种群内近交系数 Inbreeding coefficient in population (F_{is})
富民麝场 Fumin Forest Musk Deer farm	4.631 6	2.376 3	0.924 8	0.467 3	0.471 8	0.019 3
海兴麝场 Haixing Forest Musk Deer farm	4.315 8	2.183 6	0.866 9	0.435 2	0.445 0	0.023 5
P 值 P value	0.022 5	0.026 9	0.020 6	0.022 6	0.018 6	0.062 3

场林麝的基因组主要源于基因簇 3 (0.398 6%) 和基因簇 4 (0.342 5%)。

2 个种群的 Nei's 遗传距离为 0.030 6, 遗传同一性为 0.030 6。基于 Nei's 遗传距离, 对 95 个样品进行了主坐标分析, 显示 2 个种群的个体相互混合 (图 3), 同样表明每个种群内的

遗传变异较大, 2 个种群之间存在较大的基因流。

3 讨论

建立人工饲养种群, 进行重引入, 是保护濒危物种一个不可或缺的途径 (Shan et al. 2014, Barbanti et al. 2019)。重引入工作在保护

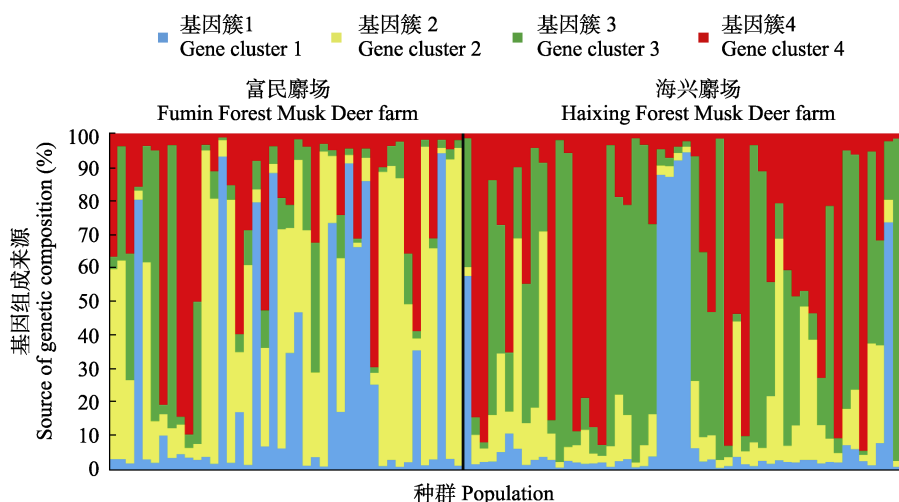


图 2 2 个饲养林麝种群的遗传结构

Fig. 2 Genetic structure of two captive *Moschus berezovskii* populations

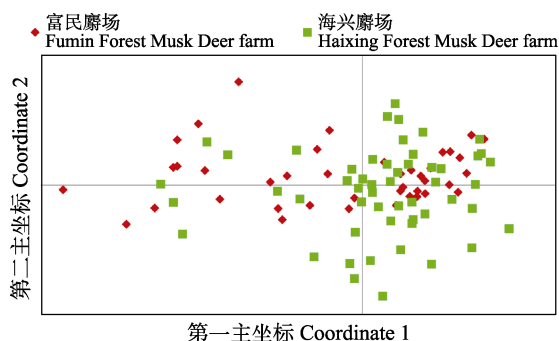


图 3 2 个饲养林麝种群的主坐标分析结果

Fig. 3 Principal coordinate analysis result of two captive *Moschus berezovskii* populations

普氏野马 (*Equus ferus przewalskii*) (Liu et al. 2014, 熊宇等 2022) 和麋鹿 (*Elaphurus davidianus*) (Zhang et al. 2021) 的实践中已经取得成功。其根本目的不仅是为了保护种群, 使种群数量快速增长, 也要确保长期的遗传变异性 (Frankham 2008, Gaughran et al. 2018)。

四碱基微卫星位点被认为是最适合于扩增及评估遗传多样性的分子标记 (Hauser et al. 2021)。本研究通过筛选前人分离的四碱基位点, 确定可以从粪便 DNA 中稳定扩增的微卫星位点, 在 25 个已发表位点中有 19 个可以成功从粪便样品中扩增, 且基因分型结果良好, 与前人研究相比, 增加了 13 个粪便 DNA 四碱

基微卫星位点 (魏浩 2020, 胡大明等 2021), 在今后的研究中可更广泛地将非损伤技术应用到林麝的分子生物学研究中。其中, 7 个位点具有高度多态性 (多态信息含量超过 0.5), 是研究遗传多样性的首选位点 (Botstein et al. 1980)。偏离哈温平衡 ($P < 0.05$) 的位点有 9 个, 种群内非随机交配可能是导致微卫星位点偏离哈温平衡的原因。

本研究 2 个种群 95 只林麝个体中, 平均多态信息含量为 0.428 3, 属于中度多态性, 平均期望杂合度为 0.467 5, 表明陕西凤县饲养林麝种群呈现较高的遗传多样性。观测杂合度低于期望杂合度, 则说明种群内有近交的趋势, 结合种群内近交系数分析, 其近交水平不高。种群遗传分化分析表明遗传变异主要来自于种群内部, 种群间分化较小, 2 个种群存在着较大的基因流; 主坐标分析同样表明 2 个种群的基因流较大, 种群间个体存在交叉混合, 再次说明 2 个种群未形成遗传分化。Structure 分析中表明, 这 2 个种群的林麝来自于 4 个基因簇, 虽然 2 个种群的分化不明显, 但是 2 个种群的林麝个体来源不同, 富民麝场的林麝主要来自于 1 和 2 基因簇, 海兴麝场的麝主要来自于 3 和 4 基因簇。陕西凤县饲养林麝奠基种群基因多样性丰富, 且饲养时间较短, 未造成遗传多

样性过度丢失, 各饲养种群间遗传分化较小, 增加各麝场的基因流有助于维持高的遗传多样性水平。

参 考 文 献

- Ahmad K, Kumar V P, Joshi B D, et al. 2016. Genetic diversity of the Tibetan antelope (*Pantholops hodgsonii*) population of Ladakh, India, its relationship with other populations and conservation implications. *BMC Research Notes*, 9(1): 477.
- Barbanti A, Martin C, Blumenthal J M, et al. 2019. How many came home? Evaluating ex-situ conservation of green turtles in the Cayman Islands. *Molecular Ecology*, 28(7): 1637–1651.
- Botstein D, White R L, Skolnick M, et al. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, 32(3): 314–331.
- Cai Y H, Yang J D, Wang J M, et al. 2020. Changes in the Population Genetic Structure of Captive Forest Musk Deer (*Moschus berezovskii*) with the Increasing Number of Generation under Closed Breeding Conditions. *Animals*, 10(2): 255.
- De Woody J A, Harder A M, Mathur S, et al. 2021. The long-standing significance of genetic diversity in conservation. *Molecular Ecology*, 30(17): 4147–4154.
- Di Rienzo A, Peterson A C, Garza J C, et al. 1994. Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(8): 3166–3170.
- Earl D A, Vonholdt B M. 2012. Structure Harvester: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics*, 4(2): 359–361.
- Ellegren H, Galtier N. 2016. Determinants of genetic diversity. *Nature Reviews Genetics*, 17(7): 422–433.
- Feng H, Wang L, Cao F J, et al. 2023. Forest Musk Deer (*Moschus berezovskii*) in China: research and protection. *Journal of Vertebrate Biology*, 72(1): 22067.
- Forest F, Grenyer R, Rouget M, et al. 2007. Preserving the evolutionary potential of floras in biodiversity hotspots. *Nature*, 445(7129): 757–760.
- Frankham R. 2008. Genetic adaptation to captivity in species conservation programs. *Molecular Ecology*, 17(1): 325–333.
- Frankham R. 2010. Challenges and opportunities of genetic approaches to biological conservation. *Biological Conservation*, 143(9): 1919–1927.
- Gauffre B, Boissinot A, Quiquempois V, et al. 2022. Agricultural intensification alters marbled newt genetic diversity and gene flow through density and dispersal reduction. *Molecular Ecology*, 31(1): 119–133.
- Gaughran S J, Quinzin M C, Miller J M, et al. 2018. Theory, practice, and conservation in the age of genomics: The Galapagos giant tortoise as a case study. *Evolutionary Applications*, 11(7): 1084–1093.
- Guichoux E, Lagache L, Wagner S, et al. 2011. Current trends in microsatellite genotyping. *Molecular Ecology Resources*, 11(4): 591–611.
- Hauser S S, Athrey G, Leberg P L. 2021. Waste not, want not: Microsatellites remain an economical and informative technology for conservation genetics. *Ecology and Evolution*, 11(22): 15800–15814.
- Hu Y B, Fan H Z, Chen Y H, et al. 2021. Spatial patterns and conservation of genetic and phylogenetic diversity of wildlife in China. *Science Advances*, 7(4): eabd5725.
- Laikre L, Hoban S, Bruford M W, et al. 2020. Post-2020 goals overlook genetic diversity. *Science*, 367(6482): 1083.
- Leigh D M, Hendry A P, Vazquez-Dominguez E, et al. 2019. Estimated six per cent loss of genetic variation in wild populations since the industrial revolution. *Evolutionary Applications*, 12(8): 1505–1512.
- Liu G, Shafer A B A, Zimmermann W, et al. 2014. Evaluating the reintroduction project of Przewalski's horse in China using genetic and pedigree data. *Biological Conservation*, 171: 288–298.
- Ma H D, Zhang D, Xiao L Y, et al. 2022. Integrating biodiversity conservation and local community perspectives in China through human dimensions research. *People and Nature*, 4(6): 1461–1474.
- Pauls S U, Nowak C, Balint M, et al. 2013. The impact of global climate change on genetic diversity within populations and species. *Molecular Ecology*, 22(4): 925–946.

- Peakall R, Smouse P E. 2010. GENALEX 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6(1): 288–295.
- Pritchard J K, Stephens M, Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2): 945–59.
- Qi W H, Lu T, Zheng C L, et al. 2020. Distribution patterns of microsatellites and development of its marker in different genomic regions of Forest Musk Deer genome based on high throughput sequencing. *Aging-Us*, 12(5): 4445–4462.
- Robinson J, Kyriazis C C, Yuan S C, et al. 2023. Deleterious variation in natural populations and implications for conservation genetics. *Annual Review of Animal Biosciences*, 11: 93–114.
- Salipante S J, Scroggins S M, Hampel H L, et al. 2014. Microsatellite instability detection by next generation sequencing. *Clinical Chemistry*, 60(9): 1192–1199.
- Shan L, Hu Y B, Zhu L F, et al. 2014. Large-scale genetic survey provides insights into the captive management and reintroduction of giant pandas. *Molecular Biology and Evolution*, 31(10): 2663–2671.
- Yang L, Wei F W, Zhan X J, et al. 2022. Evolutionary conservation genomics reveals recent speciation and local adaptation in threatened takins. *Molecular Biology and Evolution*, 39(6): 17.
- Yang S C, Lan T M, Zhang Y, et al. 2023. Genomic investigation of the Chinese alligator reveals wild-extinct genetic diversity and genomic consequences of their continuous decline. *Molecular Ecology Resources*, 23(1): 294–311.
- Yeh F C, R-C Y, Boyle T. 1998. POPGENE Version 1.31. Microsoft windows-based freeware for population genetic analysis. Edmonton, Canada: University of Alberta.
- Yousefi M, Kafash A, Nicolai M P J. 2022. Reptile richness and genetic divergence patterns were shaped by current and past climate in and around the Irano-Anatolian global biodiversity hotspot: Implications for conservation. *Diversity and Distributions*, 28(12): 2637–2647.
- Zhang Y Y, Bai J D, Zhu A N, et al. 2021. Reversing extinction in China's Pere David's deer. *Science*, 371(6530): 685–685.
- 曹新芳, 郑雪莉, 王洪永, 等. 2022. 陕西圈养林麝遗传多样性评估及核心种质构建. *东北林业大学学报*, 50(9): 114–119.
- 胡大明, 侯真真, 邓承敏, 等. 2021. 基于微卫星和线粒体的四川白水河国家级自然保护区林麝遗传多样性研究. *四川动物*, 40(6): 641–648.
- 竭航, 郑程莉, 王建明, 等. 2015. 林麝分子遗传学研究进展. *中国中药杂志*, 40(22): 4319–4323.
- 盛和林, 刘志霄. 2007. 中国麝科动物. 上海: 上海科学技术出版社.
- 唐婕, 李晶晶, 王波, 等. 2018. 两种方法从林麝粪便提取DNA效率及分析. *西北农业学报*, 27(3): 326–330.
- 唐婕, 夏健, 张博, 等. 2021. 基于 Net Framework 的林麝管理系统的构建. *中国草食动物科学*, 41(4): 56–61, 81.
- 魏浩. 2020. 林麝转录组开发微卫星位点及圈养林麝的亲缘关系分析. 西安: 西北大学硕士学位论文.
- 吴家炎, 王伟. 2006. 中国麝类. 北京: 中国林业出版社.
- 熊宇, 闫利平, 唐丽萍, 等. 2022. 重引入地生境对普氏野马胃肠道寄生虫疾病感染的风险评估. *动物学杂志*, 57(6): 866–879.
- 张立锋. 2004. 松驰选择对饲养林麝 (*Moschus berezovskii*) 遗传多样性的影响. 上海: 华东师范大学硕士学位论文.
- 郑程莉, 赵润怀, 孟智斌, 等. 2022. 我国人工养麝现状分析及展望. *中国现代中药*, 24(9): 1684–1692.

附录 1 25 个四碱基微卫星位点信息

Appendix 1 Information of 25 tetranucleotide microsatellite loci

位点 Locus	引物序列 (5'-3') Primer sequences	重复单元 Repeat unit	退火温度 Annealing temperature (°C)	是否扩增成功 Whether or not amplification	来源 Source
LS-2-1	F: GATCGAGTTGCAGGAGTC R: CACCATTCAATTCAGAGAAGC	(GCAG) 10	57	是 Yes	
LS-6-1	F: CAGGATCTGCTTCTGACATT R: ACCAAATCCAACAAGATCCG	(GATG) 8	59	是 Yes	
LS-7-1	F: TAATTAGAGGGGTGTAAGCG R: GGACCGAGCAAGTAGTAAC	(AGGA) 8	57	是 Yes	
LS-8-1	F: TGTTCTGGGATTCTTGAAG R: CATAATTGCCAAAGTGCTGT	(AGAC) 8	55	是 Yes	
LS-9-1	F: ATGAATCAACTCAGTCCCTG R: GTGGTTAGGACTCAGCATT	(ATAG) 8	59	是 Yes	
LS-12-3	F: GCGGGATCATGAGAATAGGT R: CCACATTCTCAAGTTATCCG	(CAGA) 8	61	否 No	
LS-13-1	F: TTGATCCAGTTCAGCAAAGT R: TTTGCAACTCAATCCACTG	(AGAA) 8	61	是 Yes	
LS-14-2	F: GGTCTTTCCTG TCACTCCTC R: GTCGCAGCTAC TAATGCTTT	(TGCG) 8	57	是 Yes	
LS-16-1	F: AGCCATATTCTCAAACCATT R: CAGAGAGAGACCAGGAACAAC	(AGAC) 8	57	是 Yes	
LS-17-1	F: TTAACATGACATATGGGAGAG R: TCCAGCATTATCATTATTG	(TATG) 8	57	否 No	Qi et al. 2020
LS-18-1	F: CATCCATTCATCTGTCCCTT R: TCCATCCTCTATCCAAAC	(CCAT) 8	57	是 Yes	
LS-24-1	F: TTAAACATATGCCTAAGAGTCC R: GCCCAGCAATTCTACTTCT	(TTGG) 7	57	是 Yes	
LS-27-1	F: CAGGGTAGCTCTAGATTTGT R: GAACTGGCTACTGACATTCT	(ATGG) 7	55	是 Yes	
LS-28-1	F: CCTAATTTTCCAGCTTGCAG R: AACTGGTGCATGAGTGTATT	(ATCC) 7	57	是 Yes	
LS-29-1	F: GGAAACACACATCAGAACTC R: GATTCATGTCACTGTATGGC	(TTTA) 7	57	是 Yes	
LS-30-1	F: CATCACTGAAGCGACTTAGA R: CTGACTTTCCATTGCTACCT	(ATCC) 7	57	是 Yes	
LS-31-1	F: GTGCTGTATTAGGCTTCAGA R: ATACACACTCATTCCCATCC	(ATGG) 7	57	是 Yes	
LS-35-1	F: CCCTCAATTCCTTCGATAG R: TTTGGAGATGATGGACCTTG	(TGGA) 7	57	是 Yes	
LS-47-1	F: GCCCAGCAATTCTACTTCTA R: AACATATGCCTAAGAGTCCA	(CCAA) 15	59	是 Yes	Qi et al. 2020
LS-50-1	F: GGGTTGGTATGGAAAGTTCT R: GAATGGGCTTTTATGATGGC	(TCCA) 12	61	是 Yes	
LS-56-1	F: GTACAGTACCATGCAGTCTT R: AAGTTATCCATCTCCCAACC	(CATA) 12	59	是 Yes	
Mb16	F: AATCCGTGCACAGAGGAAC R: TGGGAAAGTCTGAACTCGCT	(GCAC) 7	61.9	是 Yes	曹新芳等 2022
W4	F: CCTGGCAGGATACAGTCCAT R: TGGCAAACCTCCTGGTCAACT	(AACT) 4	61.9	否 No	
W10	F: GATGCCACTGAGCAACTGAA R: TGGCTCTGTTCTTGGAGTGA	(CACT) 4	61.9	否 No	
21353	F: GGGGTGAGAACAAGGCACTA R: CCAAGCTGACAGGTCGATTC	(GTGC) 5	57	是 Yes	魏浩 2020