

基于微卫星位点的人工圈养豚鹿亲子关系鉴定

余建秋¹ 王强¹ 刘选珍¹ 邓家波¹ 赵波¹ 牛李丽¹ 连虹² 阮向东^{3*}

(1 成都动物园, 成都 610081) (2 濒危野生动物保护遗传与繁殖教育部重点实验室, 杭州 310058)

(3 东北林业大学野生动物资源学院, 哈尔滨 150040)

摘要: 豚鹿属我国国家 I 级重点保护动物, 目前国内野生种群已经灭绝, 人工圈养数量少, 已极度濒危。成都动物园是国内最大的豚鹿饲养单位, 对该园内豚鹿进行亲子鉴定及遗传谱系建立是我国豚鹿拯救工程中一重要环节。本文利用 7 个微卫星标记对成都动物园 27 只豚鹿个体进行了基因分型, 在母本已知情况下成功鉴定了 13 对父子关系, 其中排除法鉴定 8 对, 似然法鉴定 5 对且置信度达 95%。将亲子鉴定结果辅以动物园豚鹿圈养的历史记录, 我们构建了该园豚鹿的遗传谱系图。本文的研究成果将为后续人工繁殖中亲本雌雄配对的个体选择以及种群的遗传管理提供参考。

关键词: 豚鹿; 微卫星; 亲子鉴定; 谱系

中图分类号: Q93

文献标识码: A

文章编号: 1000-1050 (2010) 02-0200-05

Paternity determination by seven microsatellite loci for the captive hog deer

YU Jianqiu¹, WANG Qiang¹, LIU Xuanzhen¹, DENG Jiabo¹, ZHAO Bo¹, NIU Lili¹, LIAN Hong², RUAN Xiangdong^{3*}

(1 Chengdu Zoo, Chengdu 610081, China)

(2 State Conservation Center for Gene Resources of Endangered Wildlife, and the Key Laboratory of Conservation Genetics and Reproductive Biology for Endangered Wild Animals of the Ministry of Education, Hangzhou 310058, China)

(3 College of Wildlife Resource, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China)

Abstract: The hog deer (*Axis porcinus*) is a Class 1 National Key Protected Species in China; the species has been extirpated within China. China has a captive population of only about 30, of which the Chengdu Zoo has 22. It is critical for captive management within China to identify paternity relationships and establish the pedigree of the hog deer population in the Chengdu Zoo. We used 7 microsatellites to genotype 22 live and 5 dead hog deer individuals from the Chengdu Zoo; we identified potential 13 paternal relationships for animals in which maternity was already known. The exclusion method defined 8 of the 13 father-offspring pairs. The likelihood method determined the remaining 5 pairs with a confidence level of 95%. Combining the result of this paternity test with the breeding records of the Chengdu Zoo, we constructed the genetic pedigree for this hog deer population. Our result will serve as an important reference for the future artificial breeding strategy and management of the captive hog deer population in China.

Key words: Hog deer (*Axis porcinus*); Microsatellite; Paternity identification; Pedigree

豚鹿 (*Axis porcinus*) 隶属哺乳纲 (Mammalia) 偶蹄目 (Artiodactyla) 鹿科 (Cervidae)。Groves 和 Grubb (1987) 的研究将该物种划分至花鹿属 (*Axis*) 下, 但近年有关学者利用线粒体标记研究, 认为豚鹿应划入鹿属 (*Cervus*) (Pitra *et al.*, 2004; Gilbert *et al.*, 2006)。目前, 豚鹿分类地位的确立仍有待于深入研究。

由于数量稀少和受威胁程度高等因素, 《濒危

野生动植物种国际贸易公约》(CITES) 早在 1975 年便将豚鹿列入其附录 I。世界自然保护联盟 (IUCN) 也在 2008 年将豚鹿收录入受威胁物种红色名录之中, 并列为濒危等级 (Timmins *et al.*, 2008)。目前, 豚鹿是斯里兰卡、老挝和巴基斯坦等国的濒危物种。在我国, 豚鹿的野外种群已灭绝 (汪松, 1998), 人工圈养的数量仅 30 余只, 是我国最稀少的鹿类动物, 被列为国家 I 级重点保护动物。

基金项目: 成都市建设管理委员会和成都大熊猫繁育研究基金会资助

作者简介: 余建秋 (1963-), 男, 博士, 研究员, 主要从事动物医学和野生动物保护方面的研究。

收稿日期: 2009-05-17; 修回日期: 2009-12-07

* 通讯作者, Corresponding author, E-mail: xdruan@163.com

目前我国仅有成都动物园、北京动物园和上海动物园等单位圈养有豚鹿，其中成都动物园现有豚鹿占我国圈养豚鹿总数的 70% 以上，是我国豚鹿人工种群持续扩大和野外种群复壮的希望。尽管有关方面已充分认识到了我国豚鹿人工圈养保护的重要性，但迄今为止，豚鹿人工圈养种群的遗传管理谱系尚未建立，在一定程度上限制了制定繁殖配对计划以及避免种群近交衰退等工作的顺利展开。圈养豚鹿的亲子鉴定及谱系建立已成为我国豚鹿拯救工程中亟待解决的科学问题。

亲子鉴定所采用的分子标记种类繁多，如同工酶、AFLP、DNA 指纹、微卫星等 (Frankham *et al.*, 2002)。其中，微卫星标记则因其共显性、高度多态性、模板量要求低和鉴定方便等优势，成为了相关领域首选 (Wan *et al.*, 2004)。而亲子鉴定所采用的数理方法则主要有三种 (Jones and Ardren, 2003)：排除法、似然法和基因型重建法。其中排除法根据孟德尔遗传定律检测母亲与可疑父本基因型组合能否产生子代基因型，若否则排除相应可疑父本。似然法则是根据等位基因频率计算各非排除父本为亲生父本的概率从而确定最大可能父本。而基因型重建较多用于存在多父本现象的物种种群结构分析中 (Amavet *et al.*, 2008)。

本文利用豚鹿基因组中筛选获得的 7 个多态性微卫星位点，对成都动物园人工圈养的 27 只豚鹿个体进行基因分型，结合排除法和似然法以确定该种群 13 个子代

个体的亲生父本，从而建立这一豚鹿种群的遗传谱系。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

27 只豚鹿样品 2006 年至 2008 年间采自成都动物园。其中：肌肉样品 1 份 (T24)，肝脏样品 2 份 (T33 和 T-x)，体检富余的血液样品 24 份。在 27 只豚鹿中，13 只子代个体的母本为已知，父本有待鉴定。

1.2 实验方法

1.2.1 实验样品的 DNA 提取

采用常规的酚氯仿抽提法 (Sambrook and Russell, 2001) 进行。

1.2.2 微卫星扩增

选用自豚鹿基因组中筛选获得的 7 个多态性微卫星位点信息 (Lian *et al.*, 2008)，详情见表 1。正向引物 5' 端标记以红外荧光标记 M13 引物 (5' - CAC GAC GTT GTA AAA CGA C - 3') 之后进行 PCR 反应。扩增体系为 10 μ L，其中含 6 ~ 10 ng 模板 DNA，1 μ L 10 \times PCR 缓冲液 (无 Mg^{2+})，2 mM $MgCl_2$ ，0.2 mM dNTPs，0.2 μ M M13 标记的正向引物，0.5 μ M 反向引物，0.3 μ M 红外荧光标记 M13 引物 (IRD - 700, LI - COR) 及 0.5 U Taq 聚合酶 (TaKaRa)。反应程序为：95 $^{\circ}C$ 预变性 5 min，35 个循环的 95 $^{\circ}C$ 30 s，退火温度 30 s (表 1)，72 $^{\circ}C$ 延伸 30 s，最后以 72 $^{\circ}C$ 延伸 5 min 结束反应。

表 1 7 个豚鹿多 性微卫星 点信息

Table 1 Locus name, primer sequence, repeat motif, annealing temperature, and GenBank Accession number for the 7 polymorphic microsatellite loci of hog deer

位点 Locus	引物序列 (5' - 3') Primer sequence (5' - 3')	重复类型 Repeat motif	退火温度 Annealing temperature ($^{\circ}C$)	GenBank 登记号 GenBank Accession No.
Apo - 1	F: GTCTGTTTCCTTTTCTTT R: TTTAGGTATCTTTCCTCCA	(AC) ₂₇	50	EU620690
Apo - 2	F: AAACAAAGAAAGAAAAAGTAGC R: TTTATAACACACGCAGGG	(GT) ₂₁	59	EU620691
Apo - 5	F: AGAAAGGTTACCGACTC R: CTGCTGCATGAAGAATG	(GT) ₂₀	50	EU620694
Apo - 6	F: GTTCATTGGGTTATTACTG R: GAAAGGAGATAGGGAGC	(AC) ₃₃	55	EU620695
Apo - 7	F: CTTGATTGTCCTACCCTCT R: ACTATGCCATGCCCTAT	(TC) ₈ (AC) ₂₁	50	EU620696
Apo - 8	F: AAAATGATAAATCGCTTGG R: TTTGCAAAATGTCCAG	(CAG) ₇	58	EU620697
Apo - 9	F: TCATCACTCAATCCCTCTA R: AACTTGACATTAACCCACT	(GT) ₁₇ GAGTGT GCAC (GT) ₁₀	54	EU620698

1.2.3 基因分型

PCR产物经6.5%变性聚丙烯酰胺凝胶电泳在LI-COR 4200自动测序仪上检测;软件SAGA^{GT}(v3.2, LI-COR)分析记录各个体的位点基因型数据。

1.2.4 亲子关系鉴定

(1) 首先利用软件NEWPAT V5 (Worthington *et al.*, 1999) 基于排除法原理筛选非排除父本。软件参数——可允许错配数 (Number of allowable mismatches) = 0。

(2) 对非排除父本大于1的情况, 利用遗传分析软件CERVUS 3.0 (Kalinowski *et al.*, 2007) 基于似然法推断亲生父本。软件参数: 平均可疑父本数量 (Candidate father) = 2, 父本取样比率 (Proportion of sampled) = 1, 位点分型比率 (Proportion of loci typed) = 1, 位点分型错误比率 (Proportion of loci mistyped) = 0.01。

1.2.5 谱系构建: 将获取的亲缘关系和该种群中一个已知亲缘关系的原始记录数据 (父-母-子-T3-T12-T26) 输入Pedigraph软件 (Garbe and Da, 2008), 构建成都动物园人工圈养豚鹿的遗传谱系图。

2 结果

2.1 亲子关系

排除法成功鉴定了8对父子关系 (Father-offspring): T9-T15, T9-T20, T9-T21, T9-Tx, T3-T33, T14-T32, T8-T24, T1-T30。子代个体T14, T16, T17, T18和T19的非排除父本数大于1, 似然法推断了它们的亲生父本且均达到95%的严密置信度。排除法和似然法鉴定结果详情见表2。

3.2 遗传谱系

Pedigraph输出的成都动物园人工圈养豚鹿的遗传谱系图见图1。

表2 成都动物园豚鹿亲子鉴定结果

Table 2 Paternity test results for 13 hog deer held at the Chengdu Zoo

子代 Offspring	性别 Sex	母本 Dam	可疑父本 Candidate father	NEWPATV5 计算 的非排除父本 Non-excluded sire calculated by NEWPAT V5	CERVUS 3.0 计算 的最大可能父本 The most likely father calculated by CERVUS 3.0	亲子鉴定确定的 父-母-子关系 Father-Mother- Offspring relationship determined by the paternity test
T15	雌 Female	T5	T1, T2, T3, T8, T9	T9	—	T9-T5-T15
T20	雄 Male	T12	T1, T2, T3, T8, T9	T9	—	T9-T12-T20
T21	雌 Female	T6	T1, T2, T3, T8, T9	T9	—	T9-T6-T21
T24	雄 Male	T11	T1, T2, T8, T9	T8	—	T8-T11-T24
T30	雌 Female	T10	T1, T2, T8	T1	—	T1-T10-T30
T32	雌 Female	T6	T3, T9, T14	T14	—	T14-T6-T32
T33	雌 Female	T15	T3, T9	T3	—	T3-T15-T33
Tx	雄 Male	T11	T1, T2, T3, T8, T9	T9	—	T9-T11-Tx
T14	雄 Male	T11	T1, T2, T3, T8, T9	T3, T9	T3*	T3-T11-T14
T16	雌 Female	T4	T1, T2, T3, T8, T9	T1, T9	T1*	T1-T4-T16
T17	雌 Female	T6	T1, T2, T3, T8, T9	T2, T9	T2*	T2-T6-T17
T18	雄 Male	T5	T1, T2, T3, T8, T9	T1, T9	T1*	T1-T5-T18
T19	雌 Female	T7	T1, T2, T3, T8, T9	T1, T3, T9	T1*	T1-T7-T19

* 表示置信度为95%

* assigned by CERVUS with 95% confidence

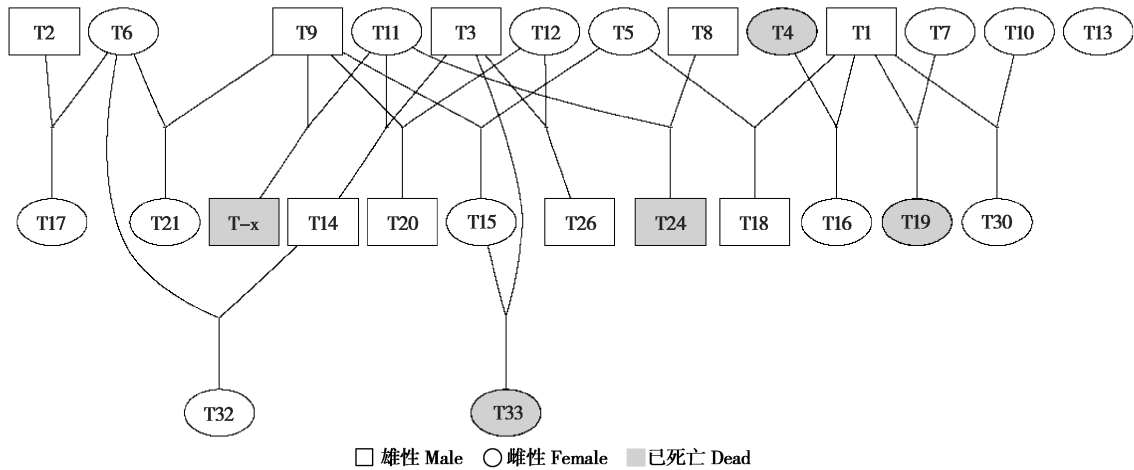


图1 成都动物园人工圈养豚鹿种群的遗传谱系图

Fig. 1 Pedigree of the captive hog deer population at the Chengdu Zoo in 2008

3 讨论

亲子鉴定所选用的遗传标记，需要符合分析软件的特异性要求，才能获得准确的分析数据 (Frankham *et al.*, 2002)。CERVUS 3.0 软件对于所选用的标记，要求包括共显性、不连锁、无空等位基因和符合哈温平衡等。Lian 等 (2008) 筛选得到本文所用的微卫星位点后进行的分析表明这 7 个位点符合哈温平衡，彼此之间不连锁且无无效等位基因，满足分析软件的特异性要求。

成都动物园人工圈养豚鹿始自 1983 年 (陈红卫等, 2006)。本次实验所取样的 27 只个体，不仅包括了现存活的全部 22 只个体，也含有已死亡的 5 只个体。对这些个体进行的数据分析如等位基因频率计算，哈温平衡检验等能够充分揭示出成都动物园豚鹿群体的种群遗传结构特征。

T1 至 T13 的 13 只个体虽然彼此的亲缘关系未知，但从构建的遗传谱系可知：第一代雄性个体 T1、T2、T3、T8 和 T9 所繁殖的子代个体数，分别为 4 只、1 只、3 只、1 只和 4 只，表明了 T1、T3 和 T9 具有较强的繁殖能力。鉴于豚鹿采取的是一雄多雌的交配方式，出于迅速扩大种群数量之需要，建议管理人员在今后制定繁殖配对计划时，优先考虑 T1、T3 和 T9 个体的繁殖任务。而出于保存种群遗传多样性和优化后续繁殖策略的考虑，亦不应忽视 T2、T8 个体在育种中的作用。由于第二代的豚鹿个体多未达到性成熟年龄，目前尚无法评估它们的繁殖能力，仅 T14 与 T6 个体成功繁殖了第三代豚鹿个体 (T32)。以本文构建的遗传谱系为依据对豚鹿繁殖策略进行的优化将为成都动物园

在未来该种群的发展中避免近亲个体的配对繁殖而造成遗传衰退做出积极贡献。

分析表明，成都动物园圈养豚鹿种群 7 个微卫星位点的平均期望杂合度 (Mean Expected Heterozygosity, H_e) 为 0.4968，亲子鉴定中单亲已知条件下父权的排除概率为 83.6%，表现出较低的多态性。但在本次实验中，由于母子关系记录详细且可疑父本数量有限，这 7 个微卫星位点的应用成功解决了所有待鉴定的父子关系，凸显了动物园信息记录的重要性。

鉴于上述，建议成都动物园在本文所建遗传谱系的条件下，进一步做好年度母子关系的繁殖记录，并对种群的所有个体，进行身份的识别标记。同时，在现有的基础上，再从豚鹿的基因组中或者检索近缘物种的微卫星，筛选数十个新的微卫星位点，以备在未来豚鹿的种群扩大中母子关系资料缺失，或疑似父亲的数量大大增加时尚能满足准确地鉴定亲子关系之用。

参考文献：

- Amavet P, Rosso E, Markariani R, Piña C I. 2008. Microsatellite DNA markers applied to detection of multiple paternity in *Caiman latirostris* in Santa Fe, Argentina. *J Exp Zool*, **309A**: 1 - 6.
- Frankham R, Ballou J D, Briscoe D A. 2002. Introduction to Conservation Genetics. New York: Cambridge University Press.
- Garbe J R, Da Y. 2008. Pedigree user manual Version 2.4. Department of Animal Science, University of Minnesota.
- Gilbert C, Ropiquet A, Hassanin A. 2006. Mitochondrial and nuclear phylogenies of Cervidae (Mammalia, Ruminantia): systematics, morphology, and biogeography. *Mol Phylogenet Evol*, **40** (1): 101 - 117.
- Groves C P, Grubb P. 1987. Relationships of living deer. In: Wemmer

- C M ed. *Biology and Management of the Cervidae*. Washington D. C. : Smithsonian Inst. Press, 21 -59.
- Jones A G, Ardren W R. 2003. Methods of parentage analysis in natural populations. *Mol Ecol*, **12**: 2511 -2523.
- Kalinowski S T, Taper M L, Marshall T C. 2007. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Mol Ecol*, **16**: 1099 - 1106.
- Lian H, Yu J Q, Ge Y F, Fang S G. 2008. Nine novel microsatellite markers for the hog deer (*Axis porcinus*). *Conserv Genet*, **10**: 681 - 683.
- Pitra C, Fickel J, Meijaard E, Groves P C. 2004. Evolution and phylogeny of old world deer. *Mol Phylogenet Evol*, **33**: 16.
- Sambrook J W, Russell D. 2001. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 463 -470.
- Timmins R J, Duckworth J W, Samba K N, Anwarul I Md, Sagar B H, Long B, Maxwell A. 2008. *Axis porcinus*. In: IUCN 2008. 2008 IUCN Red List of Threatened Species. < www.iucnredlist.org >
- Wan Q H, Wu H, Fujihara T, Fang S G. 2004. Which genetic marker for which conservation genetics issue. *Electrophoresis*, **25**: 2165 - 2176.
- Worthington W J, Allen P J, Pomeroy P P, Twiss S D, Amos W. 1999. Where have all the fathers gone? An extensive microsatellite analysis of paternity in the grey seal (*Halichoerus grypus*). *Mol Ecol*, **8**: 1417 - 1429.
- 陈红卫, 李洪文, 吴孔菊, 邓家波, 吕文其, 毛杰, 万世东. 2006. 豚鹿的饲养管理与繁殖. *四川动物*, **25** (3): 617 - 619.
- 汪松主编. 1998. 中国濒危动物红皮书—兽类. 北京: 科学出版社, 250 - 251.