

DOI: 10.5846/stxb201806261410

祝招玲, 刘振生, 高惠, 张致荣, 姚绪新, 刘鹏, 韩兴志, 王继飞, 滕丽微. 基于粪便 DNA 的贺兰山岩羊亲权鉴定和婚配制研究. 生态学报, 2019, 39(22): - .

Zhu Z L, Liu Z S, Gao H, Zhang Z R, Yao X X, Liu P, Han X Z, Wang J F, Teng L W. Parentage verification and mating system of *Pseudois nayaur* in Helan Mountains Based on Faecal DNA. Acta Ecologica Sinica, 2019, 39(22): - .

基于粪便 DNA 的贺兰山岩羊亲权鉴定和婚配制研究

祝招玲^{1,2}, 刘振生^{1,3}, 高惠¹, 张致荣¹, 姚绪新¹, 刘鹏¹, 韩兴志¹, 王继飞^{1,4}, 滕丽微^{1,3,*}

1 东北林业大学野生动物与自然保护地学院, 哈尔滨 150040

2 佳木斯大学经济与管理学院, 佳木斯 154007

3 国家林业局野生动物保护学重点开放实验室, 哈尔滨 150040

4 宁夏贺兰山国家级自然保护区管理局, 银川 750021

摘要: 2017 年 7—8 月和 11—12 月在贺兰山岩画风景区采集到 369 份岩羊新鲜粪便样本, 用多态性较高的 10 个微卫星位点进行基因分型, 共识别出 282 只岩羊个体。通过复合扩增和牙釉蛋白基因 PCR 法共鉴定出 152 只雄性, 130 只雌性。微卫星分析得到平均等位基因 (N_a) 为 10.1, 平均观测杂合度 (H_o) 为 0.7737, 平均期望杂合度 (H_e) 为 0.6512, 平均多态信息 (PIC) 为 0.6129。运用 Cervus3.0 软件进行亲权鉴定, 并用 Kingroup V2 计算个体间的亲缘系数 (r), 作为亲权鉴定的补充, 共鉴定出父-母-子 7 对, 父-子 21 对, 母-子 19 对。根据亲缘关系对岩羊的婚配制进行推测分析, 表明岩羊婚配制应属一雄多雌。

关键词: 岩羊; 亲权鉴定; 婚配制; 贺兰山

Parentage verification and mating system of *Pseudois nayaur* in Helan Mountains Based on Faecal DNA

ZHU Zhaoling^{1,2}, LIU Zhensheng^{1,3}, GAO Hui¹, ZHANG Zhirong¹, YAO Xuxin¹, LIU Peng¹, HAN Xingzhi¹, WANG Jifei^{1,4}, TENG Liwei^{1,3,*}

1 College of Wildlife and Protected Area, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

2 College of Economics and Management, Jiamusi University, Jiamusi 154007, China

3 Key Laboratory of Conservation Biology, State Forestry Administration, Harbin 150040, China

4 Helan Mountains National Nature Reserve of Ningxia, Yinchuan 750021, China

Abstract: We tested for parentage verification and mating systems in *Pseudois nayaur* in Helan Mountain Rock Painting Scenic area. 369 fresh faecal samples were collected from July to August and November to December 2017. All faecal samples were then tested through genotyping, using 10 microsatellite loci that had relatively high polymorphism. A total of 282 individuals (152 males and 130 females) were identified through compound amplification and amelogenin gene (AMELX & AMELY) PCR. A total of 101 alleles were detected in 10 microsatellite loci and the average number of alleles (N_a) was 10.1, while the mean observed and expected heterozygosities were 0.7737 and 0.6512. Furthermore, the mean value of polymorphic information contents (PIC) was 0.6129. Parentage verification was conducted on Cervus 3.0. Kingroup V2 and was used to calculate the coefficient of relationship (r) between individuals as a supplement to parental

基金项目: 中央高校基本科研业务费资助项目 (2572014CA03); 国家林业和草原局野生动植物保护与自然保护区管理司资助项目; 国家自然科学基金资助项目 (31372221, 31870512)

收稿日期: 2018-06-26; 网络出版日期: 2019-00-00

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: tenglw1975@163.com

identification. The results showed that there were 7 parentage groups, 21 father-child groups and 19 mother-child groups. Based on the analysis of these relationships, we deduced that *Pseudois nayaur* have a polygynous mating system.

Key Words: *Pseudois nayaur*; parentage verification; mating system; Helan Mountains

岩羊(*Pseudois nayaur*)属偶蹄目牛科羊亚科岩羊属,是典型的高山动物,栖息于高原丘原和高山裸岩与山谷间的草地,被世界自然保护联盟物种生存委员会(IUCN/SSC)收录为低危种,在我国重点保护野生动物名录中,被列为国家二级保护动物。目前对岩羊的研究主要集中在种群生态学^[1]、行为生态学^[2]和种群遗传学^[3]等领域。伴随着非损伤性取样(noninvasive sampling)技术的应用,利用粪便DNA结合微卫星标记对羊亚科动物进行个体识别、亲权鉴定和遗传多样性等方面开展了丰富的研究^[4-5],同时对动物的婚配制也进行了一定的研究,如对倭黑猩猩(*Pan paniscus*)^[6]、黑麂(*Muntiacus crinifrons*)^[7]、小麂(*Muntiacus reevesi*)^[8]和黑犀牛(*Diceros bicornis*)^[9]等婚配制的研究,这使得分子生物学手段成为研究岩羊亲权鉴定和婚配制的新视角。

本研究采用非损伤性取样技术,通过微卫星标记进行个体识别和亲权鉴定,并分析雌雄岩羊的交配策略,探讨岩羊的婚配制度,为进一步开展岩羊种群分子行为学研究而完成基础性技术研发工作,同时也为该物种的保护、利用和管理提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 研究地概况及样本采集

本研究采样地点为贺兰山岩画风景区(N 38°44', E 106°01'),位于贺兰山东麓,北起拜寺口,南至三关口,南北长 30 km,东西宽 4 km,海拔 1 448 m,是典型的大陆性气候特征,全年干旱少雨,年均降水量 200—400 mm 之间,年平均蒸发量 2 000 mm^[1]。植被以山杨(*Populus davidiana*)、灰榆(*Ulmus pumila*)、酸枣(*Zizyphus jujube* var. *spinosa*)、冰草(*Agropyron cristatum*)、针茅(*Stipa capillata*)、早熟禾(*Poa annua*)等为主。此处岩羊数量较多,具有一定的代表性。在 2017 年 7—8 月和 11—12 月采用样线法进行岩羊新鲜粪便样本的采集,依据贺兰山实际沟道走向和地形地貌特征布设了 7 条样线,样线长度为 2—6 km^[10]。在样线行走过程中,搜寻岩羊的新鲜粪便,若发现岩羊实体,等待岩羊自行离开后,再进行新鲜粪便样本的收集。为了避免样本交叉污染,戴口罩和一次性 PE 手套,用已消毒的镊子采集粪便样本,在新鲜的粪便中选取 20 粒左右放入 50 ml 的管中,贴上标签,每采集完一次样本,更换 PE 手套和镊子。样本采集后带回实验室,放入 -80℃ 冰箱保存。两次共获得 369 份岩羊粪便样本,岩羊皮张 1 份。

1.2 基因组 DNA 的提取和 PCR 扩增

1.2.1 DNA 提取和质量检测

岩羊粪便用试剂盒(QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit)提取 DNA,岩羊皮张用血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒提取 DNA,按照说明书进行操作。1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测岩羊粪便 DNA 质量。

1.2.2 微卫星位点的选取和 PCR 扩增

本研究通过查阅文献得到 31 对贺兰山岩羊的微卫星位点^[5,11-12],并委托生工生物工程(上海)股份有限公司(Sangon)合成引物,经多次实验后筛选出扩增稳定且多态信息含量高的 10 对引物(见表 1),在上游引物 5' 端分别标记 FAM、HEX、TAMRA 三色荧光重新合成。PCR 反应体系:总体积 12 μL, 2×PCR Buffer for KOD FX Neo 6 μL; 2 mM dNTPs 2.4 μL; 10 pmol/μL 的上、下游引物各 0.36 μL; 100 ng/μL 的 DNA 模板 1.5 μL; 1 U/50 μL KOD FX Neo 0.24 μL; ddH₂O 1.14 μL。PCR 反应程序:94℃ 预变性 2 min, 98℃ 变性 10 s, 54℃—60℃ 退火 30 s, 68℃ 延伸 30 s, 反应 35 个循环,最后 68℃ 延伸 7 min。

实验采用 Huber 等^[13]提供的 2 对引物 SRY12、BMCI009 和牙釉蛋白基因 PCR 法^[14]进行性别鉴定(见表 2)。对实验的所有样本进行 3 次 PCR 扩增,并用实验室已知性别的岩羊皮张 DNA 样本作为对照。性别鉴定

多重 PCR 扩增:出现双条带(180bp 和 300bp)判定为雄性;出现一条带(300bp)则判定为雌性。牙釉蛋白基因 PCR 扩增法:出现双条带(218bp 和 263bp)判定为雄性;出现一条带(263bp)则判定为雌性。最后比较两套 PCR 体系的结果来判断样本的性别。PCR 反应体系同上。

表 1 10 对微卫星引物序列
Table 1 Ten microsatellite primer sequences

位点 Locus	引物序列(5'—3') Primer sequence(5'—3')	等位基因 大小(bp) Allele size	退火温度/℃ Annealing temperature	荧光基团 Fluorophores	重复类型 Repeat types	文献来源 References
FCB48	gactctagaggatcgcaagaaccag gagttagtacaaggatgacaaggagcac	154—164	57	TAMRA	(TG) ₁₁ N(TG) ₃	Kappes <i>et al.</i> , 1997
ILSTS011	gcttgctacatggaaagtgc ctaaatgcagagccctacc	267—295	58	HEX	(TC) ₇ N(CA) ₁₁	Brezinsky <i>et al.</i> , 1992
BM1329	ggcaagtccaagtctttacaa gccactgtagcttgggaatc	134—146	60	FAM	(AC) ₁₃ GC(CA) ₃	Zhou <i>et al.</i> , 2007
INRABERN172	ccacttcctgtatcctcct gggtctcccallgtgtgac	218—250	56	HEX	(TC) ₆ ((TA) ₂	Vaiman <i>et al.</i> , 1996
SRCRSP3	cggggatctgttctatgaac tgattagctggctgaatgtcc	104—138	55	FAM	(TG) ₇ (TA) ₂ (TG) ₁₁	Arevalo <i>et al.</i> , 1994
JMP58	gaagtcattgagggtcgctaacc cttcatgttcacagactttctctg	118—138	56	TAMRA	(TG) ₃ N(TG) ₂₀	Dario <i>et al.</i> , 2006
PND01	ctactggactgaggaagattacc actattcgatgtcataactaggggag	159—177	58	TAMRA	(AC) ₁₉ AT(AC) ₆	Yang <i>et al.</i> , 2014
PND04	cgaclgaaatgaaggaaacga acaacaaggggatgtgaa	209—249	54	HEX	(CT) ₂₅ (CTCCCT) ₃ (CA) ₂₀	Yang <i>et al.</i> , 2014
PND05	caaagagttgggtacaactgggtga gttccaatgtcgggaagcatctatta	161—175	60	TAMRA	(AC) ₁₇	Yang <i>et al.</i> , 2014
PND06	gccaggaggagalaagtaac tccgtggcaagagtcagc	191—201	59	TAMRA	(GT) ₄ ATCT(GT) ₇ CT(GT) ₁₅	Yang <i>et al.</i> , 2014

表 2 性别鉴定引物序列
Table 2 Primer sequences of sex determination

	位点 Locus	引物序列(5'—3') Primer sequence(5'—3')	退火温度/℃ Annealing Temperature
方法一 Method one	SRY12	F cttcattgtgtggtctcgtg	57
		R cgggtatttgtctcggtgta	
	BMC1009	F gcaccagcagagaggacatt	57
		R accggctattgtccatttg	
方法二 Method two	SE47	F cagccaaacctccctctgc	62
	SE48	R cccgttggtcttgtctgttgc	

1.3 数据分析

微卫星位点的扩增产物送上海生工用 ABI 测序仪(3730xl DNA Analyzer)进行分型,用 Excel 整理微卫星数据,之后用 Cervus 3.0^[15](Allele Frequency Analysis)功能,计算等位基因数目、杂合度、多态信息含量、亲权排除概率、无效等位基因频率及 Hardy-Weinberg 平衡检测,同时对岩羊进行个体识别,鉴定个体时设定以下原则:所有微卫星座位上的基因型都相同或只有一个座位上的一个等位基因存在差异则为同一个个体^[16]。运行 Cervus 3.0 的 Simulation of Parentage Analysis 和 Parentage A nalysis 功能,由于父本、母本均未知,所以将所有雄性和雌性分别作为候选父本和候选母本,取样概率均设为 1.0(取样概率(Proportion sampled)为候选父

占取样中雄性比例及候选母占取样中雌性比例),其他选项均为系统默认值,进行亲权鉴定。实验中为了保证鉴定结果的准确性,所有位点全匹配的才确认亲子关系。使用 Kingroup V2^[17] 计算个体间的亲缘系数(r),作为亲权鉴定的补充,亲缘系数范围在-1 到 1 之间,表示亲缘相近的程度。理论上,当种群处于 Hardy-Weinberg 平衡时, $0.5 \leq r < 1$ 时为同父同母的兄弟姐妹关系, $0.25 \leq r < 0.5$ 时为同父异母或同母异父的兄弟姐妹关系^[18]。通过 Genepop^[19] 对 10 个位点组成的 45 组进行连锁不平衡检验,采用马尔科夫链法(Markov chain method)分析各位点间的连锁关系,参数均设为 5000 dememorization、100 batesh 和 5000 iteration^[20] 得到无偏估计 P 值,当 $P < 0.05$ 表明连锁不平衡具有显著性。运用 POPGENE 32^[21] 计算种群的近交系数 F_{is} 值,其值范围为-1—1, F_{is} 值为显著正值时,表示种群内存在较严重的近交现象, F_{is} 值为显著负值时,表示种群内存在远交^[22]。

2 结果

2.1 个体识别和亲权鉴定

2.1.1 基因组提取、性别鉴定和个体识别

369 份岩羊粪便全部成功提取到 DNA,经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测,岩羊粪便中提取的 DNA 片段完整,质量较高,可以直接用于 PCR 扩增,共鉴定出 282 只岩羊个体,其中雄性 152 只,雌性 130 只。性别鉴定部分结果见图 1、图 2。

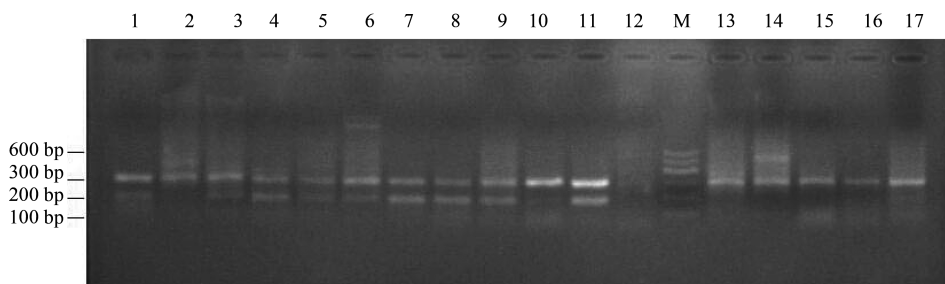


图 1 岩羊 SRY12 和 BMCI009 位点的扩增结果

Fig.1 The amplification results of SRY12 and BMCI009 loci of *Pseudois nayaur*

1—9,13—17:岩羊粪便 DNA;10:雌性岩羊皮张 DNA;11:雄性岩羊皮张 DNA;12:阴性对照

2.1.2 微卫星位点的亲权排除率

10 个微卫星位点共检测到 101 个等位基因,平均等位基因(N_a)为 10.1,PIC 在 0.452—0.825 之间,平均多态信息 0.6129,为高度多态位点($PIC > 0.5$),平均观测杂合度(H_{obs})为 0.7737,平均期望杂合度(H_{Exp})为 0.6512。 F_{is} 平均值为 -0.1836。无效等位基因(F (Null))频率极低,平均值为 -0.0790。Hardy-Weinberg 平衡检测显示,8 个位点完全符合哈温平衡,位点 SRCRSP3 和 ILSTS011 则显著偏离平衡。累积单亲排除概率为 0.9615 (累积单亲排除概率是根据多个位点累积排除任意一个可疑父亲或母亲为假父亲或假母亲的概率),累积双亲排除概率为 0.9975 (累积双亲排除概率是根据多个位点累积排除任意两个可疑父亲和母亲为假父亲和假母亲的概率)(见表 3)。

通过 Genepop 对 10 个位点组成的 45 组进行连锁不平衡检验(见表 4),由此得到 11 组连锁不平衡具有显著性的组合。经 Bonferroni^[23] 校正后,仍连锁不平衡($P < 0.05/45 = 0.0011$)的组合有 2 组,PND01 与

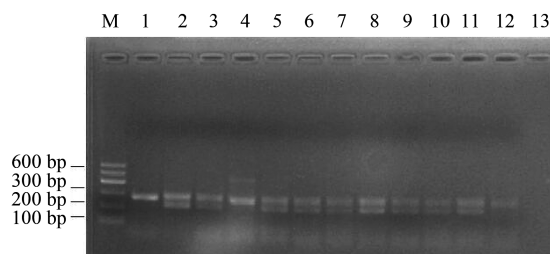


图 2 牙釉蛋白基因(AMELX 和 AMELY)扩增结果

Fig.2 The amplification results of amelogenin gene (AMELX & AMELY)

1:雌性岩羊皮张 DNA;2:雄性岩羊皮张 DNA;3—12:岩羊粪便 DNA;13:空白对照

INRABERN172,FCB48 与 PND05。

表 3 10 个微卫星位点的亲权排除概率
Table 3 Parental exclusion probability of 10 microsatellite locis

位点 Locus	等位基因数 Na	观测杂合度 HObs	期望杂合度 HExp	多态信息含量 PIC	第 1 个亲本非排除概率 NE-1P	第 2 个亲本非排除概率 NE-2P	双亲非排除概率 NE-PP	近交统计值 Fis	哈迪温伯格平衡 HW	无效等位基因 F(Null)
BM1329	6	0.642	0.545	0.503	0.840	0.679	0.504	-0.1144	NS	-0.0718
JMP58	8	0.674	0.571	0.518	0.825	0.671	0.501	-0.1465	NS	-0.0659
INRABERN172	15	0.528	0.466	0.452	0.873	0.702	0.507	-0.0937	NS	-0.0674
PND01	10	0.989	0.732	0.684	0.685	0.510	0.330	-0.6468	NS	-0.1616
SRCRSP3	11	0.844	0.716	0.677	0.684	0.504	0.310	0.1347	**	0.0626
PND05	7	0.770	0.683	0.650	0.714	0.529	0.327	-0.1648	NS	-0.0870
ILSTS011	13	0.869	0.668	0.608	0.745	0.585	0.405	-0.4228	***	-0.1881
FCB48	4	0.652	0.542	0.502	0.842	0.680	0.506	-0.1197	NS	-0.0670
PND04	21	0.950	0.841	0.825	0.464	0.300	0.122	-0.1323	NS	-0.0685
PND06	6	0.819	0.748	0.709	0.655	0.475	0.288	-0.1299	NS	-0.0749
综合非排除概率 Combined non-exclusion probability: 0.03852758 0.00246711 0.00003075										

Na:位点等位基因数,allele number of loci;HObs:位点观测杂合度,observed heterozygosity;HExp:位点期望杂合度,Expected heterozygosity;PIC:位点多态信息含量,Polymorphic information content;NE-1P:第 1 个亲本非排除概率,Combined non-exclusion probability (first parent);NE-2P:第 2 个亲本非排除概率,Combined non-exclusion probability (second parent);NE-PP:双亲非排除概率,Combined non-exclusion probability (parent pair);Fis:近交系数的 F-统计量检测值,inbreeding coefficient with F-statistics;HW:哈迪温伯格平衡 Hardy-Weinberg equilibrium;F(Null):无效等位基因频率,frequency with null;NS:不显著偏离,no significant deviation

表 4 10 个微卫星位点的连锁不平衡检验结果
Table 4 Linkage disequilibrium test result of 10 microsatellites locis

位点 Locus	JMP58	INRABERN172	PND01	SRCRSP3	PND05	ILSTS011	FCB48	PND04	PND06
BM1329	0.184652	0.079628	0.311404	0.541730	0.550108	0.142360	0.411904	0.489660	0.737142
JMP58		0.075024	0.478144	0.730038	0.483256	0.027476	0.899696	0.090316	0.230710
INRABERN172			0.000832	0.021826	0.790064	0.780590	0.939284	0.526144	0.489762
PND01				0.003466	0.780596	0.850270	0.603490	0.399176	0.276452
SRCRSP3					0.073828	0.034474	0.028742	0.011202	0.340938
PND05						0.330932	0.000766	0.745178	0.011512
ILSTS011							0.903720	0.031408	0.092482
FCB48								0.947706	0.152080
PND04									0.003806
PND06									

按照多态信息含量(PIC)由低到高和由高到低的顺序依次增加微卫星位点数进行累积排除率分析,结果由图 3 可知,随着微卫星位点数的增加,累积排除率逐渐增加,当微卫星位点达到 7 个(PIC 由高到低)和 9 个(PIC 由低到高)时,累积亲权排除概率大于 0.9900,说明所筛选的 10 个微卫星卫点能进行准确的亲权判定。

2.1.3 亲权鉴定

运用 Cervus3.0 软件的 Parent pair(Sexes known)功能进行亲权鉴定,共鉴定出父-母-子 7 对,父-子 21 对,母-子 19 对。28 对父-子的亲缘系数(r)在 0.5000—0.8462 之间,26 对母-子的亲缘系数(r)在 0.5000—0.8000 之间,所有父子间、母子间、同父同母个体间的亲缘系数平均分别为 0.6164、0.6251 和 0.5426。实验中运用 10 个微卫星位点进行亲子鉴定,亲权排除概率为 99.75%。

2.2 婚配制度

由表 5、表 6 可知,X162(♂)、X173(♂)各自 3 个后代间的亲缘系数在 $0.25 \leq r < 0.5$ 之间,说明 X162(♂)、X173(♂)均与 3 个雌性交配过;D31(♀)、D33(♀)、D18(♀)、X168(♀)、D148(♀)各自后代间的亲缘系数在 $0.5 \leq r < 1$ 之间,说明它们只与 1 个雄性交配过;D73(♀)、D78(♀)、D89(♀)各自后代间的亲缘系数在 $0.25 \leq r < 0.5$ 之间,说明它们与 2 个雄性交配过;X163(♂)、X3(♂)、D145(♂)、X160(♂)、X112(♂)、D15(♂)各自后代间的亲缘系数在 $0.25 \leq r < 0.5$ 之间,说明它们与 2 个雌交配过;D45(♂)、D70(♂)各自后代间的亲缘系数在 $0.5 \leq r < 1$ 之间,说明它们只与 1 个雌性交配过。研究中多次出现 1 个雄性与 2 个或 2 个以上的雌性交配并产下后代,可知岩羊的婚配制属于一雄多雌。

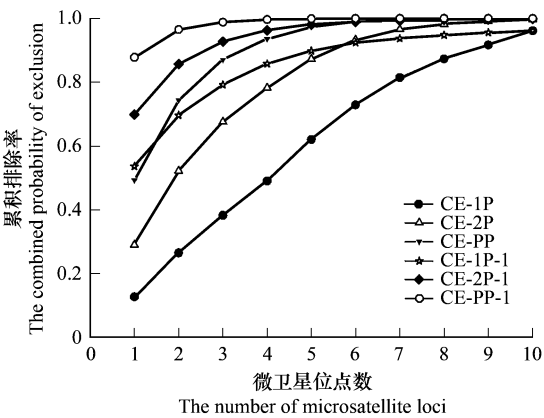


图 3 微卫星位点数与累积排除率之间的关系
Fig. 3 Relationship between the combined probability of exclusion and the number of microsatellite loci

CE-1P,CE-2P,CE-PP:PIC 由低到高排列的累积排除概率;CE-1P-1,CE-2P-1,CE-PP-1:PIC 由高到低排列的累积排除概率

表 5 岩羊的亲子关系和亲缘系数

Table 5 The coefficient of parentage and genetic relationship in *Pseudois nayaur*

母本 Mother	父本 Father	后代 Offspring	母子间亲 缘系数 $r(m,o)$	父子间亲 缘系数 $r(f,o)$	母本 Mother	父本 Father	后代 Offspring	母子间亲 缘系数 $r(m,o)$	父子间亲 缘系数 $r(f,o)$
D73	X163	D9	0.5312	0.5312		D45	D123		0.5000
D8	X24	D59	0.5588	0.6471		D45	D57		0.6250
D95	X3	D107	0.5000	0.5455		D70	X147		0.6250
D31	D136	D23	0.8000	0.6000		D70	D27		0.7750
D5	D21	D150	0.6000	0.7000	X110		X128	0.5312	
X152	X162	X155	0.5714	0.5312	X77		X39	0.625	
D42	D145	D7	0.5312	0.5701	X77		D29	0.6842	
	X156	X144		0.5227	D33		D102	0.6786	
	D65	D49		0.6471	D35		D60	0.625	
	D68	D149		0.6463	X141		D82	0.5833	
	X3	D46		0.8462	D33		D38	0.7219	
	X173	X189		0.6023	D18		X146	0.6364	
	X173	X181		0.6023	D18		X134	0.7273	
	X173	D5		0.6023	X168		X217	0.6739	
	X162	X13		0.6139	X168		D48	0.6739	
	X162	X172		0.8367	D148		D47	0.6471	
	X160	D10		0.5500	D148		D101	0.7353	
	X160	X154		0.7000	D31		D55	0.6734	
	D145	D20		0.5893	D73		D87	0.7656	
	X112	D112		0.5483	D78		D28	0.5444	
	X112	X116		0.6363	D78		D43	0.6098	
	X163	D19		0.5000	D89		X141	0.5455	
	D15	D106		0.6667	D89		D54	0.6364	
	D15	D108		0.5000					

表 6 后代之间的亲缘系数

Table 6 The relationship coefficient among the offsprings

后代 Offspring	后代 Offspring	亲缘系数 Relationship coefficient	后代 Offspring	后代 Offspring	亲缘系数 Relationship coefficient
X181(♂)	X189(♂)	0.3636	X13(♂)	X172(♂)	0.2522
D5(♀)	X189(♂)	0.3257	X155(♂)	X172(♂)	0.3889
D5(♀)	X181(♂)	0.3636	X13(♂)	X155(♂)	0.3889
D9(♂)	D19(♂)	0.3000	D9(♂)	D87(♂)	0.4706
D107(♀)	D46(♂)	0.4167	D102(♀)	D38(♂)	0.5312
D7(♂)	D20(♂)	0.2696	X146(♀)	X134(♀)	0.5312
D10(♀)	X154(♀)	0.4000	X217(♀)	D48(♂)	0.5435
D112(♂)	X116(♂)	0.4050	D47(♀)	D101(♀)	0.5588
D106(♀)	D108(♂)	0.2500	D23(♂)	D55(♂)	0.5833
D123(♂)	D57(♀)	0.5000	D28(♂)	D43(♂)	0.3196
X147(♀)	D27(♀)	0.5500	X141(♀)	D54(♂)	0.2727

3 讨论

3.1 亲权鉴定

目前普遍采用 STR 来鉴定个体间的亲权关系,其排除非亲本能力依赖于微卫星位点数和等位基因的多样性^[24]。一般 8—10 个及以上微卫星位点即可确定较高的亲权鉴定准确率^[15]。本研究选用 10 个高度多态性(PIC>0.5)微卫星位点(见表 3),进行亲权鉴定是可行的。

无效等位基因是影响亲权鉴定准确性的基础因素,本研究使用的 10 个微卫星位点,杂合子丰富,无效等位基因频率极低,而 Cervus3.0 软件使用似然率(似然率即某一可疑父亲的似然值相对于理想父亲似然值的比)容许这些错误的存在,在统计处理上可以有效降低错配的敏感性,使亲权鉴定结果更加科学化,同时还可以充分使用所占有的遗传资料^[25-26]。Hardy-Weinberg 平衡检验结果发现共有 2 个微卫星位点出现偏离平衡的现象,其余 8 个位点处于平衡状态,Cervus 中一两个座位的 Hardy-Weinberg 不平衡并不影响亲权分析中似然比的计算。 F_{is} 为负值,说明种群内不存在近交。贺兰山岩羊是生活在特殊环境下的一个边缘种群,集小群,随着季节的变化,其集群类型、集群大小均会发生一定的变化,这种边缘种群在适应性进化过程中可能会导致不平衡选择,使得基因组中的某些位点偏离 Hardy-Weinberg 平衡^[5]。10 个位点经校正后有 2 组连锁不平衡具有显著性,可能是因为无效等位基因的存在导致了这些组合连锁不平衡。

一般情况下,参照国际常用标准,RCP>95%,倾向有亲子关系;RCP>99.73%,认定有亲子关系^[25];对于人类的亲权判定,累积排除概率 99.0%—99.8%即可认定为极其成立的亲子关系^[27];王跃峰利用 5 个微卫星位点对白头叶猴进行个体识别和亲缘鉴定,得到累积非父排除概率为 99.70%^[28];程文科对 144 头猪进行个体亲子鉴定时得到累积非父排除率为 98.35%,与系谱记录结果完全相同^[4];郭立平利用 8 个微卫星位点在 3 种情况下为西门塔尔牛进行亲子鉴定,累积排除概率分别为 99%、99.95%和 99.99%,鉴定结果与系谱一致^[29]。

实验中亲权排除概率为 99.75%,并用 Kingroup V2 确定亲缘系数,进一步验证了亲权鉴定的准确性。因此,实验中采用的 10 对微卫星位点完全可以达到亲子鉴定的要求。

3.2 岩羊的婚配制度

陈小南^[7]用 70 个黑鹿个体粪便样本、任鹏^[8]用 177 个小鹿个体粪便样本、Garnier^[9]用 35 只野生黑犀牛的粪便样本在亲权鉴定的基础上,通过分析雌雄间的交配关系确定婚配制。本研究利用 282 只岩羊个体粪便样本,根据岩羊雌雄间的交配关系研究婚配制度,在样本数量上完全满足实验要求。

通常把婚配制度分为单配制(monogamy)和多配制(polygamy),多配制又包括一雄多雌(polygyny)、一雌多雄(polyandry)和混交制(promiscuity),动物选择哪一种婚配制度受个体之间的相互作用和对外界环境适应

的影响^[30]。研究动物的婚配制度,需要注意在一个繁殖季节里,个体以什么样的方式获得配偶,获得配偶的数量以及雌雄个体的育幼行为等因素^[31]。

新疆天山北山羊(*Capra sibirica*)倾向于组成“一雄多雌”的小群完成交配^[32]。捻角山羊(*Capra falconeri*)是一雄多雌的交配系统^[33]。赤羊(*Ovis vignei*)在交配时期,雄性赤羊会由独居转为与4—5头雌性赤羊居住,是一雄多雌的交配系统^[33]。盘羊(*Ovis ammon*)在交配期间,活动区域选择地势平坦、避风暖和的低海拔区域,雄羊和雌羊开始集群,5—6只雄盘羊和数十只雌盘羊一起活动,雄性盘羊间争偶激烈,相互剧烈格斗,胜者获取这群盘羊的交配权,交配季节结束后,雌雄又分开活动^[34]。叉角羚(*Antilocapra americana*)在交配季节占据了不设防的领地,雄性保护雌性的后宫^[35]。阿尔卑斯羴羊(*Capra ibex*)似乎能够通过坚持它们之间预先建立的稳定的优势关系来减少因争斗而消耗的能量,年长的雄性通常采取抚育策略垄断与雌性交配的机会,而年轻的、处于从属地位的雄性通过悄悄接近雌性的策略获得交配,但成功率总体上较低^[36]。贺兰山岩羊集小群,发情期雌雄群、混合群和独羊比例显著上升,雌性岩羊相对分散,部分雄性岩羊在不同群之间迁移寻找发情的雌性岩羊,并通过争斗获得优势地位,进一步获得交配权,尽可能增加繁殖机会^[37],这一现象说明了实验中1只雌性与2只雄性岩羊交配并产下后代的现象是在雌性不同的繁殖期之间,同时也证实了实验中1只雄性与多只雌性岩羊交配并产下后代的结果,推测岩羊是一雄多雌的婚配制度。

哺乳动物具有较长的妊娠期和哺乳期,雄性动物在此期间不能提供更多的帮助,而是倾向于尽可能多地与多个雌性交配,这是提高自身适合度的一种进化选择^[38]。岩羊发情交配期在每年的11月末到12月,在12月中旬时达到高峰,母羊经过大约160 d的妊娠期后在次年5月中旬到6月中旬产仔,哺乳期3个月^[39],这期间雄性岩羊不参与育幼活动,由雌性岩羊哺育下一代,观察发现母仔群出现的频率在一年的四个季节中均最高^[10]。由于岩羊雌雄两性在婚配中投资的不平衡性,促使雄性岩羊有更多的时间和精力参与到繁殖行为中,获得与更多雌性交配的机会,这也验证了实验研究的结果,雄性岩羊与多个雌性岩羊交配并产下后代,表明岩羊是一雄多雌制的婚配制度。

实验从分子生物学角度对贺兰山岩羊进行亲权鉴定和婚配制研究,填补了这一领域的研究空白,并为进一步开展岩羊种群分子行为学研究积累基础资料。同时对采用非损伤性取样技术研究有蹄类动物的个体识别、性别鉴定、亲权鉴定和婚配制等具有重要意义,特别是对濒危有蹄类动物的保护和利用提供了新的研究方法和视角。此外,希望通过实验的研究成果,可以为有关部门和科研单位提供有效数据,促进形成一套更加完整的贺兰山岩羊保护、利用和管理体系。

致谢:宁夏贺兰山国家级自然保护区管理局胡天华高级工程师在野外调查中给予的帮助,特此致谢!

参考文献(References):

- [1] 王小明,李明,唐绍祥,刘志霄.春季岩羊种群生态学特征的初步研究.兽类学报,1998,18(1):27-33.
- [2] 崔多英.贺兰山岩羊(*Pseudois nayaur*)的家域、活动规律和采食生态学研究[D].上海:华东师范大学,2007.
- [3] 李楠楠,刘振生,王正寰,黄丽红.基于细胞色素*b*基因的中国岩羊不同地理种群遗传差异分析.生态学报,2012,32(8):2381-2389.
- [4] 程文科.微卫星标记用于猪和羊亲子鉴定快速、简便方法的研究[D].武汉:华中农业大学,2011.
- [5] 刘旭.基于分子生物学的岩羊个体迁移扩散研究[D].上海:华东师范大学,2014.
- [6] Gerloff U, Hartung B, Fruth B, Hohmann G, Tautz D. Intracommunity relationships, dispersal pattern and paternity success in a wild living community of Bonobos (*Pan paniscus*) determined from DNA analysis of faecal samples. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 1999, 266(1424):1189-1195.
- [7] 陈小南.基于粪便DNA的黑鹿婚配制及家域的研究[D].金华:浙江师范大学,2014.
- [8] 任鹏,龚堃,鲍毅新,黄相相,周晓,韩金巧.基于粪便DNA的小鹿亲权鉴定和婚配制研究.生态学报,2017,37(20):6933-6944.
- [9] Garnier J N, Bruford M W, Goossens B. Mating system and reproductive skew in the black rhinoceros. Molecular Ecology, 2001, 10(8):2031-2041.
- [10] 刘振生,李新庆,王小明,李志刚,胡天华,翟昊.贺兰山岩羊(*Pseudois nayaur*)集群特征的季节变化.生态学报,2009,29(6):

2782-2788.

- [11] 李艳香. 中国岩羊 (*Pseudois nayaur*) 遗传多样性与遗传结构研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2014.
- [12] Yang M, Peng Q K, Jiang L C, Tan S, Peng R, Zou F D. Development and characterization of nine polymorphic microsatellite markers for the blue sheep (*Pseudois nayaur*). *Conservation Genetics Resources*, 2015, 7(1): 183-185.
- [13] Huber S, Bruns U, Arnold W. Sex determination of red deer using polymerase chain reaction of DNA from feces. *Wildlife Society Bulletin (1973-2006)*, 2002, 30(1): 208-212.
- [14] Ennis S, Gallagher T F. A PCR-based sex-determination assay in cattle based on the bovine amelogenin locus. *Animal Genetics*, 1994, 25(6): 425-427.
- [15] Kalinowski S T, Taper M L, Marshall T C. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology*, 2007, 16(5): 1099-1106.
- [16] Bellemain E, Swenson J E, Tallmon D, Brunberg S, Taberlet P. Estimating population size of elusive animals with DNA from hunter-collected feces; four methods for brown bears. *Conservation Biology*, 2005, 19(1): 150-161.
- [17] Konovalov D A, Manning C, Henshaw M T. KINGROUP: a program for pedigree relationship reconstruction and kin group assignments using genetic markers. *Molecular Ecology Notes*, 2004, 4(4): 779-782.
- [18] Blouin M S, Parsons M, Lacaille V, Lotz S. Use of microsatellite loci to classify individuals by relatedness. *Molecular Ecology*, 1996, 5(3): 393-401.
- [19] Raymond M, Rousset F. GenePop (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*, 1995, 86, 248-249.
- [20] 吴海龙. 黑鹿保护遗传学研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2006.
- [21] Raymond M, Rousset F. GENEPOP (Version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*, 1995, 86(3): 248-249.
- [22] 修云芳. 我国圈养小熊猫种群遗传多样性分析与亲权鉴定[D]. 扬州: 扬州大学, 2015.
- [23] Benjamini Y, Yekutieli D. The control of the false discovery rate in multiple testing under dependency. *The Annals of Statistics*, 2001, 29(4): 1165-1188.
- [24] Louis Bernatchez P D. Individual-based genotype analysis in studies of parentage and population assignment; how many loci, how many alleles? *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2000, 57(1): 1-12.
- [25] 张辉. 基于粪便分子生物学的马鹿个体识别、亲缘关系分析及家域确定[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2010.
- [26] Saneristobal M, Chevalet C. Error tolerant parent identification from a finite set of individuals. *Genetics Research*, 1997, 70(1): 53-62.
- [27] 郑秀芬. 法医 DNA 分析. 北京: 中国人民公安大学出版社, 2002: 422-424.
- [28] 王跃峰. 白头叶猴的个体识别及亲缘关系的研究[D]. 桂林: 广西师范大学, 2006.
- [29] 郭立平, 徐丽, 朱森, 张路培, 高会江, 李俊雅, 许尚忠, 高雪. 西门塔尔牛微卫星亲子鉴定体系的优化. *畜牧兽医学报*, 2013, 44(6): 871-879.
- [30] 张建军, 张知彬. 动物的婚配制度. *动物学杂志*, 2003, 38(2): 84-89.
- [31] Emlen S T, Oring L W. Ecology, sexual selection, and the evolution of mating systems. *Science*, 1977, 197(4300): 215-223.
- [32] 朱新胜, 汪沐阳, 杨维康, Blank D. 新疆天山中部北山羊社群结构. *兽类学报*, 2016, 36(1): 56-63.
- [33] Caughley G. *Analysis of Vertebrate Populations*. New York: Wiley, 1977: 234.
- [34] 阿利·阿布塔里普, 车利锋. 不同区域盘羊特性研究. *特产研究*, 2016, 38(3): 11-17.
- [35] Maher C R. Activity budgets and mating system of male pronghorn antelope at Sheldon national wildlife refuge, Nevada. *Journal of Mammalogy*, 1991, 72(4): 739-744.
- [36] Willis C S, Neuhaus P. The ecology of reproduction in long-lived male Alpine ibex (*Capra ibex*): the role of age, dominance and alternative mating tactics[D]. Neuchâtel: Université de Neuchâtel, 2012.
- [37] 李新庆, 刘振生, 王小明, 崔多英, 李志刚, 胡天华. 发情交配期贺兰山岩羊的集群特征. *兽类学报*, 2007, 27(1): 39-44.
- [38] Alcock J. *Animal behavior—An evolutionary approach*. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, 1975.
- [39] 刘振生. 岩羊 (*Pseudois nayaur*) 生态学研究[D]. 上海: 华东师范大学, 2006.