

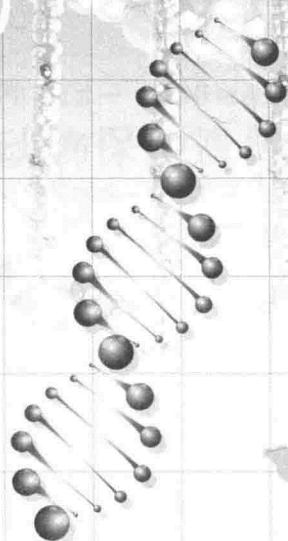
Study on Conservation Genetics
of Endangered Animals

张于光 李迪强 等 编著

濒危动物 保护遗传学研究

中国林业出版社

Study on Conservation Genetics
of Endangered Animals



濒危动物 保护遗传学研究

张于光 李迪强 等 □ 编著

中国林业出版社

图书在版编目(CIP)数据

濒危动物保护遗传学研究 / 张于光, 李迪强等编著. —北京: 中国林业出版社, 2015. 9

ISBN 978-7-5038-8157-2

I. ①濒… II. ①张… ②李… III. ①濒危动物-动物保护-遗传学-研究 IV. ①Q958.1

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2015)第 220861 号

责任编辑: 肖静

出版 中国林业出版社(100009 北京西城区德内大街刘海胡同 7 号)

网址 www.lycb.forestry.gov.cn

电话 (010)83143577

发行 中国林业出版社

印刷 北京卡乐富印刷有限公司

版次 2015 年 9 月第 1 版

印次 2015 年 9 月第 1 次

开本 787mm × 1092mm 1/16

印张 21

字数 550 千字

定价 69.00 元



《濒危动物保护遗传学研究》 编写委员会

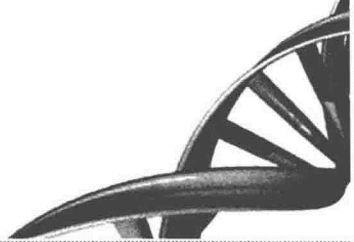
主 编 张于光 李迪强

主要编写人员（按姓氏笔画先后排序）

王秀磊	刘 芳	李 佳	李 娜
李迪强	何 丽	张于光	周 慧
周芸芸	洪艳云	蔡重阳	薛亚东

前言

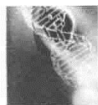
FOREWORD



近30年来,在保护生物学的研究和实践过程中,人们逐渐将遗传学的原理和方法运用于生物多样性的研究和保护,成为保护生物学中一个十分活跃的研究领域和方法,并由此产生了一门新的学科——保护遗传学。保护遗传学的主要目标是保护物种遗传多样性和物种进化潜力,通常关注的是濒危小种群或者衰退中的种群。濒危物种的种群一般较小,小种群的遗传后果如遗传多样性降低、近交衰退等,往往无法避免。遗传结构的不利变化将加大濒危物种在变化环境中的灭绝风险。在短时期内,它们可能降低物种的生殖和生存能力;从长远看,它们将削弱种群应对环境变化的进化潜力。毫无疑问,它们是一些物种灭绝的原因,同时,也是目前物种濒危的重要因素。

把遗传学上的理论预测与实际的管理策略放在一起综合考虑,对于物种的保护是很重要的。一方面,我们要对许多物种的自然发展历史、分布、行为方式和生态学方面的知识有广泛的了解,这就必须有生态学、统计学和野生生物的管理理论及从事自然保护区和野生濒危物种管理专家们的宝贵经验等作为支撑。另一方面,遗传学研究为遗传多样性评估提供了越来越强大的分子生物学技术,也为濒危和非濒危物种提供了越来越多的数据资料。如果不能将这些知识形成广泛有效的管理策略,将会导致一些小种群和片段化种群走向灭绝,增加物种遗传枯竭和提高灭绝的风险。由于受现有人力、物力和时间的限制,我们不可能将所有的物种以及物种的所有种群纳入保护计划。因此,在开展任何保护活动之前,必须制定出科学合理的保护策略和计划。

我国是世界上生物多样性较为丰富的12个国家之一,拥有森林、灌丛、草甸、草原、荒漠和湿地等地球陆地生态系统,拥有脊椎动物6445种,占世界总种数的13.7%。中国不仅物种丰富,而且物种特有程度高,其中脊椎动物特有种数达667种,包括大熊猫、金丝猴、藏羚、普氏原羚、华南虎等73种特有哺乳动物。长期以来,由于受到人口持续增长和经济快速发展导致的栖息地丧失和退化、传统生活方式延续等因素的影响,我国的野生动物资源处于过度消耗状态,呈现濒危程度不断加剧,总体下降的趋势。2011年发布的中国生物多样性保护战略与行动计划表明,中国有233种脊椎动物面临灭绝。来自理论和实验的确切证据表明,遗传学因素与物种的灭绝和濒危有密切关系,物种通常是在遗传学因素与统计学因素和环境因素(偶然性事件、环境灾害等)的共同作用下趋于衰退而走向灭绝的。因此,选择我国典型的特有珍稀濒危物种,阐述其遗传多样性现状和变化趋势,对制定有效的保护策略,实现物种的可持续发展具有重要价值和意义。



本书是作者多年来在濒危动物保护遗传学方面的研究总结,写作过程中兼顾了保护遗传学的重要基础理论、主要研究方法及其在典型珍稀濒危动物保护中的应用。本书第1、第2章从物种濒危的遗传学原理和遗传多样性的保护理论方面对保护遗传学的主要基础理论进行了阐述;第3至第10章分别对常用的DNA遗传标记、高通量测序技术、种群生存力分析、景观遗传学、非损伤性DNA技术和数据统计方法等保护遗传学研究中的常用方法进行了总结和概述;第11至第19章分别以东北虎、普氏原羚、雪豹、藏羚、川金丝猴、野双峰驼和金丝野牦牛等我国珍稀濒危物种为例,对作者开展的保护遗传学研究和基于遗传多样性的保护等工作进行了总结。

全书由张于光和李迪强主持编写,总体设计和拟定了章节内容,并最后完成统稿。章节的具体分工为:第1章和第2章由张于光负责,第3章由李佳、李迪强负责,第4章由张于光负责,第5章由张于光、洪艳云负责,第6章和第7章由张于光负责,第8章由薛亚东负责,第9章由张于光、李娜负责,第10章由张于光、周芸芸负责,第11章由张于光、李迪强负责,第12章由李娜、王秀磊、李迪强负责,第13章由周芸芸、张于光负责,第14章由周慧、张于光、李迪强负责,第15章由何丽、张于光、李迪强负责,第16章由洪艳云、张于光、李迪强负责,第17章由周芸芸、张于光、刘芳、李迪强负责,第18章由薛亚东负责,第19章由蔡重阳、张于光、李迪强负责。

近年来,保护遗传学在理论和方法等方面发展迅猛,很多重要的进展本书未能加以详细的介绍和评述;同时,由于作者水平有限,加之成稿仓促,错误和疏漏之处在所难免,恳请批评指正。

本书的部分研究工作和出版得到了“十二五”国家科技支撑计划课题“神农架金丝猴遗传多样性保护和管理关键技术研究(2013BAD03B02)”资助,在此特表示感谢。

作 者

2015年7月20日

目 录

CONTENTS



前 言

第1章 物种濒危的遗传学原理	1
1.1 遗传多样性	1
1.1.1 遗传多样性的概念	1
1.1.2 遗传多样性的度量指标	2
1.1.3 遗传多样性的丧失	3
1.1.4 遗传多样性的维持和保护	4
1.2 近交衰退	7
1.2.1 近 交	7
1.2.2 近交衰退	7
1.2.3 近交衰退的避免和恢复	8
1.3 遗传漂变	9
参考文献	11
第2章 濒危物种的遗传管理基础	14
2.1 物种分类地位的确定	14
2.1.1 物种的定义	14
2.1.2 物种的确定	15
2.2 进化显著单元的确定	16
2.2.1 进化显著单元的定义	16
2.2.2 进化显著单元的确定	16
2.3 亲缘关系鉴定	17
2.3.1 亲缘关系鉴定的意义	17
2.3.2 亲缘关系鉴定	17
2.4 野外种群数量调查	18
2.5 种群遗传结构研究	19
2.6 保护策略的制定	20
参考文献	21



第3章 濒危物种的种群生存力研究	24
3.1 PVA的产生和发展	24
3.2 PVA模型	24
3.3 PVA在保护生物学中的应用	25
3.4 PVA存在的问题	27
3.5 PVA在普氏原羚生境管理中的应用	28
3.5.1 数据来源与分析软件	28
3.5.2 模拟情景	30
3.5.3 模拟结果	31
3.5.4 普氏原羚保护途径探讨	33
3.6 PVA在梅花鹿种群管理中的应用	34
3.6.1 研究地点	34
3.6.2 研究方法	35
3.6.3 参数估计	35
3.6.4 结果	38
3.6.5 讨论	40
3.7 PVA未来发展趋势	41
3.7.1 显空间模型	41
3.7.2 近交衰退效应	41
3.7.3 降低入侵物种的威胁	41
参考文献	41
第4章 保护遗传学中常用的DNA遗传标记	45
4.1 PCR的基本原理	45
4.1.1 PCR的原理	45
4.1.2 PCR的一般程序与方法	46
4.2 限制性片段长度多态性	47
4.2.1 限制性片段长度多态性的基本原理	47
4.2.2 限制性片段长度多态性的特点	47
4.3 随机扩增片段多态性DNA	47
4.3.1 随机扩增片段多态性的基本原理	47
4.3.2 随机扩增片段多态性的特点	48
4.4 扩增片段长度多态性分析	48
4.4.1 扩增片段长度多态性的基本原理	48
4.4.2 扩增片段长度多态性的特点	49
4.5 小卫星多态性	49



4.5.1 小卫星多态性的基本原理	49
4.5.2 小卫星多态性的特点	49
4.6 微卫星多态性	50
4.6.1 微卫星多态性的基本原理	50
4.6.2 微卫星多态性的特点	51
4.7 单核苷酸多态性	51
4.7.1 单核苷酸多态性的基本原理	51
4.7.2 单核苷酸多态性的特点	52
4.8 主要组织相容性复合体	53
4.9 DNA 条形码	53
参考文献	54
第5章 线粒体 DNA 及其在保护遗传学中的应用	57
5.1 动物线粒体 DNA 的结构和特点	57
5.1.1 动物线粒体 DNA 的结构	57
5.1.2 动物线粒体 DNA 的特点	57
5.2 动物线粒体 DNA 多态性分析方法	58
5.2.1 DNA 序列分析一般步骤	58
5.2.2 引物选择	59
5.2.3 DNA 提取扩增与纯化	59
5.2.4 系统发生分析	59
5.3 线粒体 DNA 多态性分析在保护遗传学中的应用	59
5.3.1 物种的鉴定	59
5.3.2 种群遗传变异	61
5.3.3 物种亲缘关系和系统进化	61
5.4 线粒体 DNA 异质性研究进展	63
5.4.1 线粒体 DNA 异质性的定义	63
5.4.2 线粒体 DNA 异质性研究进展	63
5.4.3 线粒体异质性鉴定方法	64
5.4.4 线粒体异质检测和筛查基本策略	64
5.4.5 线粒体 DNA 异质性产生的机制	65
参考文献	65
第6章 微卫星标记及其在保护遗传学中的应用	70
6.1 微卫星标记的结构和遗传特性	70
6.1.1 微卫星标记的结构	70
6.1.2 微卫星标记产生的机制	71



6.1.3	微卫星的功能	71
6.2	微卫星 DNA 位点的获得	71
6.2.1	利用已发现的微卫星位点寻找新的位点	71
6.2.2	用经典分子生物学方法克隆所需要的微卫星位点	72
6.3	微卫星 DNA 分析的一般步骤	72
6.3.1	DNA 的提取	72
6.3.2	PCR 的扩增	73
6.3.3	扩增产物及大小的检测	73
6.3.4	数据分析	73
6.4	生物芯片与微卫星技术	73
6.5	微卫星标记的应用	74
6.5.1	构建遗传连锁图谱	74
6.5.2	标记辅助选择育种	74
6.5.3	亲子鉴定和遗传谱系	75
6.5.4	个体识别和种群数量估算	75
6.5.5	种群动态和进化历史	75
6.5.6	种群遗传多样性研究	77
	参考文献	78
第 7 章	高通量测序技术及其应用	82
7.1	二代测序(next-generation sequencing, NGS)	82
7.1.1	二代测序技术的原理	83
7.1.2	二代测序技术的应用	83
7.1.3	二代测序技术发展的挑战	86
7.2	RAD-seq 测序技术	86
7.2.1	RAD-seq 技术流程	87
7.2.2	RAD-seq 技术的应用	88
7.2.3	展 望	90
	参考文献	90
第 8 章	景观遗传学及其研究进展	93
8.1	景观遗传学	93
8.1.1	景观结构与遗传多样性	93
8.1.2	景观遗传学的概念	94
8.2	景观遗传学的研究方法和时空尺度	95
8.2.1	确定空间遗传格局	95
8.2.2	遗传格局与景观特征的相关性分析	96



8.2.3 景观遗传学研究的时空尺度	96
8.3 景观遗传学的主要研究进展	96
8.3.1 景观破碎化的遗传效应	96
8.3.2 景观遗传学与连接度	97
8.3.3 物种对景观破碎化效应的影响	98
8.4 展 望	99
参考文献	99
第9章 非损伤性 DNA 及其在保护遗传学研究中的应用	103
9.1 非损伤性取样技术	103
9.2 非损伤性样品 DNA 的提取	104
9.2.1 毛发 DNA 的提取	104
9.2.2 粪便 DNA 的提取	104
9.2.3 牙齿样本 DNA 的提取	104
9.2.4 骨骼中 DNA 的提取	105
9.2.5 干皮张样品 DNA 的提取	105
9.2.6 酒精或福尔马林浸泡皮张标本的 DNA 提取	105
9.2.7 羽毛 DNA 的提取	105
9.2.8 血斑标本 DNA 的提取	106
9.2.9 微量血 DNA 的提取	106
9.2.10 绒毛标本 DNA 的提取	106
9.2.11 羊水标本 DNA 的提取	106
9.2.12 口腔上皮细胞标本 DNA 的提取	106
9.3 普氏原羚粪便样品的保存和 DNA 提取	107
9.3.1 研究方法	107
9.3.2 结果与分析	108
9.3.3 讨 论	112
参考文献	114
第10章 常用的保护遗传学数据统计和分析	117
10.1 个体识别和性别鉴定	117
10.1.1 个体识别	117
10.1.2 性别鉴定	118
10.2 种群大小与历史动态	118
10.2.1 种群大小估算	118
10.2.2 种群历史动态	119
10.3 遗传多样性	120



10.4	种群遗传结构	122
10.5	亲权鉴定与亲缘关系	124
10.5.1	亲权鉴定	124
10.5.2	亲缘关系	125
	参考文献	126
第11章	饲养东北虎的亲权鉴定和遗传多样性研究	131
11.1	引言	131
11.1.1	东北虎概况	131
11.1.2	饲养东北虎种群存在的遗传问题	131
11.2	饲养东北虎的亲权鉴定研究	132
11.2.1	实验样品来源和背景	132
11.2.2	微卫星基因座	134
11.2.3	基因组 DNA 的提取	134
11.2.4	PCR 扩增及微卫星位点的筛选	135
11.2.5	数据统计分析	137
11.2.6	微卫星位点的筛选结果	138
11.2.7	饲养东北虎的亲权鉴定	140
11.2.8	讨论	141
11.3	饲养东北虎的遗传多样性研究	143
11.3.1	实验样品	143
11.3.2	研究方法	143
11.3.3	饲养东北虎的遗传多样性	144
11.3.4	讨论	146
11.4	饲养东北虎的遗传分析和评价	149
11.4.1	遗传分析	149
11.4.2	种群评价	153
	参考文献	154
第12章	普氏原羚的保护遗传学研究	156
12.1	引言	156
12.2	青海湖哈尔盖地区普氏原羚种群遗传多样性研究	157
12.2.1	研究方法	157
12.2.2	哈尔盖地区普氏原羚种群遗传多样性	159
12.2.3	讨论	165
12.3	普氏原羚的种群遗传多样性研究	165
12.3.1	研究方法	166



12.3.2 普氏原羚种群遗传多样性	166
12.3.3 讨 论	174
参考文献	177
第 13 章 雪豹的保护遗传学研究	179
13.1 引 言	179
13.2 基于粪便 mtDNA 的雪豹遗传结构研究	180
13.2.1 样品收集	180
13.2.2 粪便 DNA 的提取和 <i>cytb</i> 基因扩增	181
13.2.3 物种鉴定和数据分析	181
13.2.4 物种鉴定和遗传结构分析	181
13.3 不同区域雪豹 mtDNA 遗传多样性研究	183
13.3.1 实验样品	183
13.3.2 DNA 提取和 mtDNA 的 PCR 扩增	184
13.3.3 物种鉴定和数据统计分析	185
13.3.4 基于 mtDNA <i>cytb</i> 基因的雪豹物种鉴定和遗传结构	185
13.3.5 讨 论	189
13.4 雪豹的微卫星 DNA 遗传多样性研究	191
13.4.1 实验样品	191
13.4.2 微卫星引物和 PCR 扩增	191
13.4.3 基于微卫星 DNA 的雪豹保护遗传学研究	193
13.4.4 讨 论	201
13.5 雪豹的保护建议	203
参考文献	204
第 14 章 藏羚的保护遗传学研究	206
14.1 引 言	206
14.1.1 藏羚的概况	206
14.1.2 藏羚的迁徙习性	206
14.1.3 藏羚面临的威胁	207
14.2 藏羚的 mtDNA 遗传多样性研究	208
14.2.1 研究样品	208
14.2.2 研究方法	208
14.2.3 藏羚 mtDNA 的遗传多样性	209
14.2.4 讨 论	214
14.3 藏羚的微卫星 DNA 多态性研究	217
14.3.1 研究样品	217



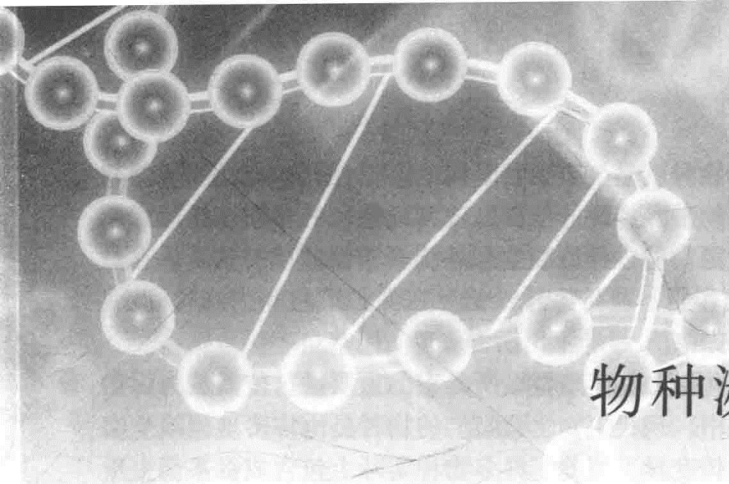
14.3.2	微卫星 DNA 研究方法	218
14.3.3	藏羚微卫星 DNA 多态性	219
14.3.4	讨 论	222
	参考文献	224
第 15 章	川金丝猴的保护遗传学研究	226
15.1	引 言	226
15.1.1	川金丝猴概况	226
15.1.2	川金丝猴保护遗传学研究进展	227
15.2	基于线粒体 DNA 的川金丝猴遗传结构研究	228
15.2.1	材料与方法	228
15.2.2	结果与分析	230
15.2.3	讨 论	235
15.3	基于微卫星标记的川金丝猴遗传结构	238
15.3.1	微卫星位点的筛选	238
15.3.2	微卫星 PCR 扩增及其基因分型	240
15.3.3	粪便样品的性别鉴定	241
15.3.4	数据统计分析	241
15.3.5	结果与分析	242
15.3.6	讨 论	248
	参考文献	251
第 16 章	野双峰驼的保护遗传学研究	254
16.1	引 言	254
16.1.1	野双峰驼概况	254
16.1.2	野双峰驼研究进展	255
16.2	野双峰驼的遗传多样性和遗传结构研究	256
16.2.1	样品采集	256
16.2.2	粪便 DNA 的提取	256
16.2.3	性别鉴定基因 <i>SRY</i> 的 PCR 扩增	257
16.2.4	粪便微卫星位点 PCR 扩增和分型	257
16.2.5	数据分析	258
16.3	野双峰驼种群遗传多样性和遗传结构	259
16.3.1	微卫星位点的多态性	259
16.3.2	个体识别	260
16.3.3	性别鉴定	261
16.3.4	群体遗传结构	262



16.3.5 地理群体遗传分化	264
16.4 讨 论	266
参考文献	268
第 17 章 金丝野牦牛的遗传分类地位初探	271
17.1 引 言	271
17.2 研究方法	271
17.2.1 实验材料	271
17.2.2 基因组 DNA 提取、PCR 扩增及测序	272
17.2.3 数据分析	272
17.3 结果与分析	273
17.3.1 DNA 提取结果	273
17.3.2 线粒体基因序列的碱基组成及差异比较	273
17.3.3 遗传距离	273
17.3.4 系统进化树	273
17.4 讨 论	275
参考文献	276
第 18 章 结合景观遗传学的滇金丝猴栖息地景观连接度研究	278
18.1 引 言	278
18.2 研究方法	279
18.2.1 研究区概况	279
18.2.2 地理数据及处理	280
18.2.3 景观指数选取及计算	281
18.2.4 最小费用距离模型	284
18.2.5 遗传数据	285
18.2.6 景观连接度	285
18.2.7 生物廊道	286
18.3 景观分析	286
18.3.1 景观格局分析及破碎化评价	286
18.3.2 景观组分的面积特征	287
18.3.3 景观组分的周长特征	288
18.3.4 景观组分的斑块面积特征	288
18.3.5 景观组分的斑块形状特征	289
18.3.6 景观多样性与均匀度	289
18.4 景观连接度分析	289
18.4.1 最佳模型	289



18.4.2	扩散费用分析	291
18.4.3	连接度评价	291
18.4.4	潜在廊道分析	292
参考文献		294
第 19 章 普氏原羚的肠道微生物多样性研究		296
19.1	引言	296
19.2	不同保存方法对肠道微生物 DNA 的影响	297
19.2.1	样品采集及处理	297
19.2.2	粪便总 DNA 提取	298
19.2.3	16S rDNA 的 PCR 扩增及回收	298
19.2.4	数据分析	299
19.2.5	结果与分析	299
19.2.6	讨论	303
19.3	普氏原羚的肠道微生物多样性研究	305
19.3.1	样品采集	305
19.3.2	肠道微生物的 T-RFLP 研究	306
19.3.3	16S rDNA 克隆文库及系统发育树构建	307
19.3.4	普氏原羚的肠道微生物多样性	309
19.3.5	普氏原羚肠道微生物多样性分析	314
参考文献		316



第 1 章

物种濒危的遗传学原理

生物多样性保护的关键之一是保护物种,更具体地说就是保护物种的遗传多样性或进化潜力。自 20 世纪 90 年代以来,越来越多的证据表明濒危物种种群的遗传变化与种群命运息息相关(Frankham et al., 2002; Wan et al., 2005; 方盛国等, 2008),特别是遗传多样性的降低和近交衰退在物种灭绝中起着十分重要的作用。因为遗传多样性不仅决定了物种对变化的环境的适应能力,也影响着物种的现时适合度,任何物种只有拥有一定水平的遗传多样性才可能应对不断变化的环境给予的生存压力。一些科学家运用遗传学的相关技术手段对许多濒危物种的生存现状进行了精确描述,这些遗传检测结果已经为政府主管部门制定相应的管理计划和保护措施提供了科学依据,且对这些濒危物种的保护产生了显著的效果(Frankham et al., 2002)。

随着分子遗传学、群体遗传学、生态学等学科的迅速发展,濒危物种的保护遗传管理在研究内容和研究方法上得到了不断的拓展和完善。濒危小种群遗传行为的研究已经成为保护遗传学研究的一个热点,如近亲繁殖导致种群遗传衰退,遗传漂变对群体遗传结构产生影响,小种群遗传多样性丧失等(Frankham et al., 2002)。濒危物种遗传多样性的降低在短期内可能会降低物种的繁育能力,从长期来看将削弱种群对环境变化的适应潜力,在恶劣的环境下这些濒危物种总是极易遭受灭绝。当遗传多样性水平降低、近交衰退加剧时就会增加小种群灭绝的概率(Lynch & Lande, 1998)。由于濒危物种种群一般较小,小种群的遗传后果如遗传多样性降低、近交衰退等,往往无法避免,遗传结构的不利改变将加大濒危物种在变化环境中的灭绝风险。毫无疑问,它们是很多物种灭绝的原因,同时,也是目前物种濒危的重要因素。研究显示多数濒危物种已经受到遗传多样性降低的危害(Spielman et al., 2004),随着灭绝风险的增高,物种的平均杂合度显著降低(Evans & Sheldon, 2008)。因此,对濒危物种的长期生存而言,遗传多样性及其相关因素是保护的核心。

1.1 遗传多样性

1.1.1 遗传多样性的概念

遗传多样性也称基因多样性,遗传多样性的概念有不同的层次,广义的遗传多样性是指地球上所有生物所携带的遗传信息的总和(McNeely et al., 1990),而 1992 年世界资源研究所(WRI)等在《全球生物多样性策略》中将之特指为物种内基因的变化,此为狭义的