



研究论文 ORIGINAL PAPERS

基于微卫星的大熊猫群体
遗传多样性分析及亲子鉴定刘晨阳¹, 王晓宇², 张美晗¹, 张文涛¹,
张丹辉², 沈洁娜², 雷颖虎², 咎林森^{1*}, 成功^{1*}(1. 西北农林科技大学动物科技学院, 杨凌 712100;
2. 陕西省林业科学院秦岭大熊猫研究中心, 周至 710402)

稿件运行过程

收稿日期: 2024-11-30
修回日期: 2025-02-20关键词: 大熊猫;
粪便样本;
微卫星;
遗传多样性;
亲子鉴定Keywords: Giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*);
Fecal samples;
Microsatellites;
Genetic diversity;
Paternity testing

中图分类号: Q953; S863

文献标志码: A

文章编号:

2310-1490(2025)-04-0774-11

DOI: 10.12375/ysdwx.202411039

摘要

为了探究秦岭大熊猫(*Ailuropoda melanoleuca qinlingensis*)圈养种群的遗传多样性和亲子关系,指导其科学繁育,本研究建立了一套优化的技术体系。利用筛选出的9个高分辨率微卫星位点(以四碱基重复为主)进行PCR扩增与毛细管电泳分型,并对32只个体进行遗传多样性分析。结果显示:通过均质化与热孵育预处理,显著提升了粪便样本中宿主基因组DNA的得率与质量。秦岭大熊猫群体 H_o 为0.281~0.938,平均为0.596, H_e 为0.391~0.793,平均为0.560, $H_o > H_e$,说明基因杂合度水平高;多态信息含量(PIC)为0.351~0.747,平均为0.499,其中3个位点为高度多态性,其余为中度多态性,群体遗传多样性高。亲子关系鉴定结果显示,利用9对微卫星引物组合在双亲未知时单亲累积排除概率(CE-1P)达0.999 999,双亲之一已知时单亲累积排除概率(CE-2P)达0.999 978,双亲未知时亲本对累积排除概率(CE-PP)达0.999 088。基于上述方法及PopGen32与iTOL的遗传距离聚类分析,成功明确了5只子代的父本来源。研究结果为完善大熊猫遗传谱系、防止近交衰退及制定科学配种方案提供了可靠的技术支持和关键数据。

基金项目: 陕西省林业科技创新计划专项(SXLK2021-0102, SXLK-2022-0204, SXLK2023-04-1, SXLK2024-0308); 中国科协青年人才托举工程项目(YESS20220333)

第一作者简介: 刘晨阳(2001—),女,硕士研究生;主要从事动物遗传育种与繁殖研究。E-mail:lchenyang2021@163.com

*通信作者: 咎林森, E-mail:zanlinsen@163.com; 成功, E-mail:chenggong@nwafu.edu.cn

Analysis of Genetic Diversity and Parentage Identification of Giant Panda Populations Based on Microsatellite

LIU Chenyang¹, WANG Xiaoyu², ZHANG Meihan¹, ZHANG Wentao¹,
ZHANG Danhui², SHEN Jiena², LEI Yinghu², ZAN Linsen^{1*}, CHENG Gong^{1*}

(1. College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling 712100, China;
2. Research Center for the Qinling Giant Panda, Shaanxi Academy of Forestry, Zhouzhi 710402, China)

Abstract: To explore the genetic diversity and parentage relationships of the captive Qinling giant pandas (*Ailuropoda melanoleuca qinlingensis*) population and to guide scientific breeding efforts, this study established an optimized protocol. Nine high-resolution microsatellite loci (predominantly tetranucleotide repeats) were screened for PCR amplification and capillary electrophoresis genotyping, and genetic diversity analysis was performed on 32 individuals. The results demonstrated that pretreatment of samples via homogenization and heat incubation significantly improved the yield and quality of host genomic DNA extracted from feces. The observed heterozygosity (H_o) ranged from 0.281 to 0.938 (mean = 0.596), and the expected heterozygosity (H_e) ranged from 0.391 to 0.793 (mean = 0.560). Notably, the average observed heterozygosity was slightly higher than the average expected heterozygosity ($H_o > H_e$), indicating a high level of genetic heterozygosity. The polymorphic information content (PIC) varied from 0.351 to 0.747 (mean = 0.499); among these loci, three were highly polymorphic and the remaining were moderately polymorphic, indicating high population genetic diversity. Results of parentage relationships identification showed that using the combination of nine pairs of microsatellite primers: the cumulative exclusion probability for one parent (CE-1P) reached 0.999 999 when both parents were unknown, the cumulative exclusion probability for one parent (CE-2P) reached 0.999 978 when one parent was known, and the cumulative exclusion probability for parent pairs (CE-PP) reached 0.999 088 when both parents were unknown. Based on the above methods and genetic distance clustering analysis using PopGen32 and iTOL, the paternity of five offspring was successfully identified. This study provides reliable technical support and critical data for refining the genetic pedigree of giant pandas, preventing inbreeding depression, and formulating scientific breeding plans.

秦岭大熊猫(*Ailuropoda melanoleuca qinlingensis*)在形态学和分子生物学等特征方面与四川、甘肃的大熊猫存在明显差异,是大熊猫的一个独立亚种^[1]。作为一个独特的大熊猫亚种,秦岭大熊猫在遗传多样性保护方面具有重要地位。全国第四次大熊猫调查结果表明,秦岭大熊猫种群数量在六大山系(秦岭、岷山、邛崃山、大相岭、小相岭和凉山)中排名第三,种群密度居全国之首,但其遗传多样性相对较低,且与其他山系种群遗传分化较大^[2]。野生秦岭大熊猫种群因建群者数量少,容易导致近交衰退。因此,准确鉴定个体间的亲缘关系,构建可靠的遗传谱系,对实施科学有效的遗传管理至关重要。在人工繁育实践中,为提高大熊猫在短暂发情期内的受孕成功率,常采用多次本交的方式,但这易导致部分

子代父系来源不明、系谱不清,进而增加近亲繁殖的风险,制约种群可持续繁育^[3]。为此,建立一套准确、高效的大熊猫遗传多样性评估及亲子鉴定技术体系,完善种群谱系档案,已成为大熊猫保护工作中的迫切需求。

微卫星(microsatellite)标记又称短串联重复序列(short tandem repeats, STRs)或简单重复序列(simple sequence repeats, SSR),它是均匀分布于基因组中的简单重复序列,由2~6个核苷酸串联重复构成。因其具有多态性高、共显性遗传和检测灵敏度高优点,在种群遗传变异研究方面应用广泛,是遗传多样性评估及亲子鉴定常用的分子标记^[4-6]。目前,用于大熊猫遗传多样性研究的微卫星标记较多,但位点多态性不同,后续的基因分型也存在差

异,故无法进行统一的比较分析^[7-12]。此外,二碱基重复微卫星位点易造成基因型误判^[13],从而影响亲子鉴定结果的准确性。为此,本研究筛选出9个以四碱基重复为主的高分辨率微卫星位点,用于秦岭圈养大熊猫的基因分型,以期提高分型准确率。

非损伤取样是珍稀野生动物遗传研究中常用的样本收集方法。粪便样本因其取样方便、对动物干扰小和易于保存等优点,被广泛用于遗传学评估^[14-15]。通过提取粪便中肠道脱落上皮细胞的DNA,可进一步开展亲子鉴定、食性分析和肠道微生物组成等研究^[16-18]。然而,粪便中宿主细胞含量低,且常混杂微生物及食物残渣,导致宿主DNA提取难度大、质量不稳定。因此,如何提高粪便样本中宿主DNA的得率与质量,是进行候选分子检测的关键。

本研究通过优化粪便基因组DNA提取方法,获得了高质量的大熊猫基因组DNA。进一步利用筛选的9对高分辨率微卫星引物进行大熊猫微卫星检测,通过Cervus 3.0、PopGen32等软件分析完成32只大熊猫的群体遗传多样性、亲缘关系及群体遗传距离分析,明确个体间的亲子关系。研究结果对于指导大熊猫的繁育工作具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

大熊猫粪便样本采集自陕西省林业科学院秦岭大熊猫研究中心(陕西珍稀野生动物救助基地,楼观台)的圈养个体。

1.2 方法

1.2.1 样品采集

采用非损伤性取样法,操作人员佩戴无菌手套,采集大熊猫新鲜粪便样本。用镊子剥离、采集粪便表面带有黏膜的部分,立即置于无菌冻存管中,在液氮中速冻后于-80℃超低温冰箱中保存备用。

1.2.2 粪便基因组DNA提取与优化

粪便样本基因组DNA利用QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit试剂盒提取,具体操作在试剂盒说明书基础上进行了优化:称取200 mg粪便样本置于2 mL离心管中,置于冰上操作。均质组(优化组)在离心管中加入1 mL Inhibit EX Buffer,同时放入2个5 mm研磨珠,经高通量组织研磨仪(TissueLyser II)在30 Hz、90 s条件下均质,之后将样本在95℃水浴中孵育

7 min后振荡15 s;14 000 r/min离心1 min,收集上清液用于后续纯化步骤。对照组则严格按试剂盒说明书操作,不进行研磨均质化与高温孵育处理。对提取的基因组DNA使用50 μL洗脱液洗脱后通过酶标仪测定其浓度和质量。

1.2.3 RT-qPCR检测

为评估所提DNA中大熊猫来源基因组的比例与质量,将对照组与优化组提取的DNA参照TB Green Premix Ex Taq II试剂盒(TaKaRa)说明书进行RT-qPCR。反应体系:50 ng基因组DNA,7.5 μL TB Green Premix Ex Taq II,上、下游引物各0.3 μL(10 μmol/L),补充ddH₂O至15.0 μL。引物:GAPDH-F 5'-ATCCCGCCAACATCAAAT-3',GAPDH-R 5'-GCGTTCTTCTCGCTACACC-3',预期产物长度为153 bp;GLUD1-F 5'-TCTCTTTTCACCATGCGGACAG-3',GLUD1-R 5'-AGCCAGAGCCTTCACTTCATC-3',预期产物长度为113 bp。RT-qPCR产物用1.5%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.4 微卫星筛选及PCR反应条件优化

基于前人研究工作,筛选9对四碱基为主的高分辨率微卫星引物组合(表1)^[10,19-21],由北京擎科生物科技有限公司合成。PCR反应体系:12.5 μL PrimeSTAR Max或Premix Taq DNA聚合酶,上、下游引物各0.3 μL(10 μmol/L),基因组DNA 5.0 μL,添加ddH₂O至25.0 μL,具体PCR程序参照说明书。扩增产物用1.5%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.5 毛细管电泳分型

5'端荧光基因修饰的微卫星引物由北京擎科生物科技有限公司合成。其中,gpz-6、GPL-31、AY-79荧光为FAM,GPL-60、gpy-5为ROX,gpy-20、GP-901、GP-08为HEX,Panda-40为TAM。PCR扩增产物于-20℃避光保存,送生工生物工程(上海)股份有限公司进行毛细管电泳测序,通过基因分型获得相应微卫星位点多态信息。

1.2.6 数据统计与分析

将基因型数据导入Cervus 3.0软件^[22]中,利用allele frequency analysis分析群体遗传多样性;利用simulation of parentage analysis中paternity进行10 000次亲权模拟评估置信度;利用parentage analysis中的paternity根据候选父本进行亲子鉴定。此外,利用PopGen32软件^[23]计算个体间Nei's遗传

表1 大熊猫9对微卫星位点引物信息

Table 1 Information of nine polymorphic microsatellite loci for *Ailuropoda melanoleuca*

位点名称 Locus name	引物序列 (5'→3') Primer sequence (5'→3')	重复单元 Repeat unit	退火温度 /°C T_m	产物长度 /bp Product size	DNA 聚合酶 DNA polymerase
gpz-6 ^[20]	F: CCTGGCAGGGCAAAGTATT R: CCCCCTGAAAACATCAAGAC	(AAAG) _n	52	202	PrimeSTAR Max
GPL-60 ^[20]	F: TGCCGAAAGTTCTAAGCAT R: TTTCTCTCCCTCTCCCTTC	(TCTT) _n	52	218	PrimeSTAR Max
gpy-20 ^[19]	F: GCAGGCACTCAAGAGGTGTT R: CCTTGTGCTAAACACAGGTGA	(TTTG) _n	54	165	PrimeSTAR Max
gpy-5 ^[19]	F: CTCGGGAGCTTTGTACCATC R: CAGAGAGCCCAAACCTCAAC	(AACT) _n	54	228	PrimeSTAR Max
GP-901 ^[21]	F: AGCTAATTTTCCAAGTTACCTTTCC R: GGATCTGGGTGTTATTTGCAATG	(CA) _n	52	158	PrimeSTAR Max
Panda-40 ^[19]	F: CCTACCTATTTACCTACTTACCTACC R: GATGCTATTAAGCAACAGAC	(TATC) _n	48	124	Premix Taq
GPL-31 ^[20]	F: GCATCCTTGTCTCTTTGGAG R: GCATTGTTTTCTACTCTACAAATATCC	(ATCT) _n	50	139	Premix Taq
GP-08 ^[21]	F: AACATCCTGGGTATTCTCCATGC R: TGCAGAGTGAGGACCTAGGTCTC	(AC) _n	56	160	Premix Taq
AY-79 ^[10]	F: GAGCACTCTTGGGTTTTGTTA R: TGGTGGCAGGAATGAT	(GT) _n	52	145	Premix Taq

距离,并利用 iTOL(<https://itol.embl.de/>)构建邻接法系统聚类树,可视化展示个体间的亲缘关系。

2 结果与分析

2.1 粪便样本大熊猫基因组 DNA 提取优化

按照 QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit 试剂盒步

骤提取粪便基因组 DNA 并进行部分优化。对同等质量(200 mg)的大熊猫粪便样本经过 30 Hz、90 s 均质及 95 °C 水浴孵育 7 min 优化处理后,粪便样本更加均质,提取的基因组 DNA 平均质量浓度为 24 ng/μL,较未均质的对照组提高了 15.24%(图 1)。

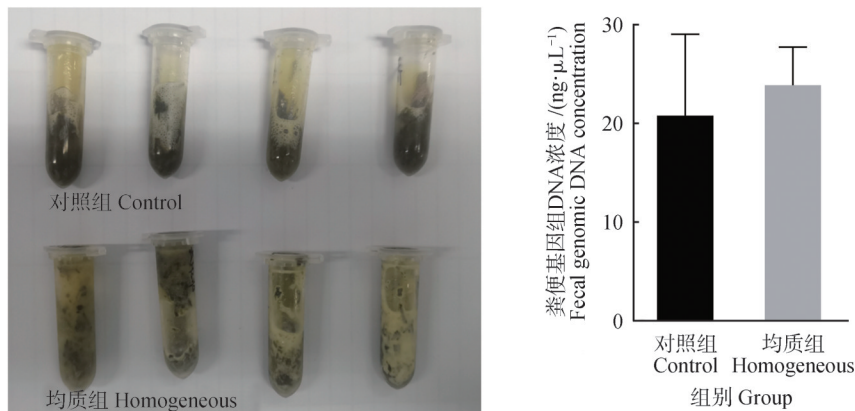


图1 均质组与对照组的粪样均质化及粪便基因组 DNA 质量浓度差异

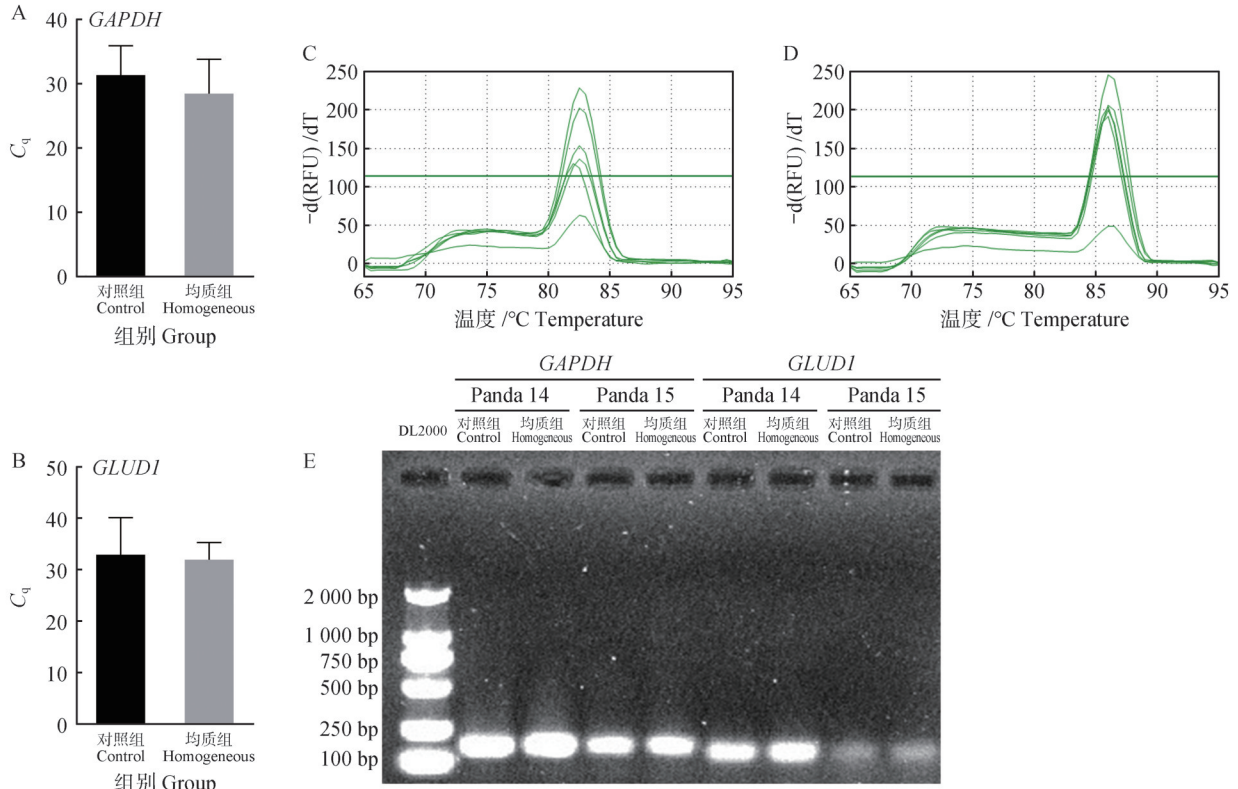
Figure 1 Comparison of fecal homogenization and concentration of fecal genomic DNA between the homogeneous group and the control group

粪便样本提取的宿主基因组 DNA 中常混杂肠道微生物及食物来源基因组,为评估均质化是否能提高大熊猫基因组 DNA 的得率,进一步取 50 ng 基因组 DNA 作为模板,对大熊猫的甘油醛-3-磷酸脱氢

酶基因(*GAPDH*)和谷氨酸脱氢酶基因(*GLUD1*)进行 RT-qPCR 及产物琼脂糖凝胶电泳进行验证。溶解曲线显示,两基因扩增峰相对单一,表明引物特异性良好(图 2C, 2D)。RT-qPCR 结果表明,与对照组相比,

均质组中两基因的 C_q 值均低于对照组(图 2A, 2B), 即反应体系中荧光信号达到设定阈值时所需的 PCR 循环数少, 提示其宿主来源的基因组 DNA 含量占总

基因组含量更高; 琼脂糖凝胶电泳也进一步证实均质组 RT-qPCR 产物得率显著高于对照组(图 2E)。



A, B. 均质组与对照组 *GAPDH* 和 *GLUDI* C_q 值; C, D. *GAPDH* 和 *GLUDI* RT-qPCR 熔解曲线; E. 扩增产物电泳检测结果。

A, B. The C_q values of *GAPDH* and *GLUDI* in the homogeneous group and the control group; C, D. Melting curves of *GAPDH* and *GLUDI* RT-qPCR; E. Electrophoresis results of the amplified products.

图2 均质组与对照组粪便样本基因组的 RT-qPCR 及其产物电泳检测结果

Figure 2 RT-qPCR results and product electrophoresis of fecal sample genomes in the homogenized group and control group

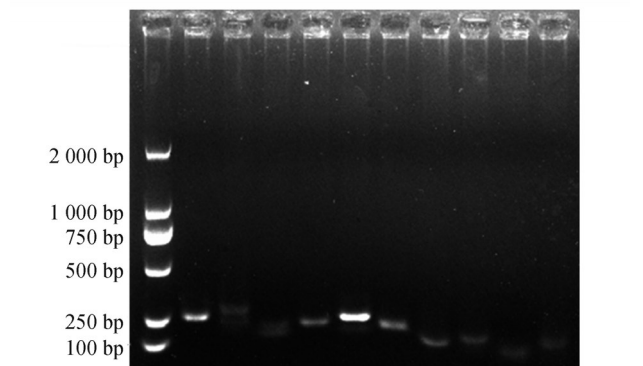
上述结果表明, 通过均质化结合热孵育的预处理, 本研究成功建立了从大熊猫粪便样本中高效提取高质量宿主基因组 DNA 的方法。

2.2 微卫星位点的筛选及检测

以优化提取方法提取的粪便基因组 DNA 为模板, 利用筛选出的 9 对高分辨率微卫星引物进行 PCR 扩增。琼脂糖凝胶电泳结果表明, 所有位点均扩增出清晰、特异的条带, 无非特异性扩增或引物二聚体(图 3), 可用于后续毛细管电泳与基因分型。

2.3 群体遗传多样性分析

根据基因分型结果, 应用 Cervus 3.0 对检测的 32 只大熊猫进行群体遗传多样性分析, 结果如表 2、表 3 所示。各位点等位基因数为 3~6 个, 平均值为 4.667。其中, GPL-60、GPL-31 与 AY-79 的等位基因数最多(均检测出 6 个), 而 gpy-20 与 GP-08 的等位基



从左至右分别为 DL2000 DNA Marker, gpy-5、GPL-60、gpy-20、GP-08、gpz-6、GP-901、GPL-31、AY-79、Panda-40。

From left to right, DL2000 DNA Marker, gpy-5, GPL-60, gpy-20, GP-08, gpz-6, GP-901, GPL-31, AY-79, Panda-40.

图3 9对微卫星引物 PCR 扩增产物电泳结果

Figure 3 Electrophoresis detection of PCR amplification products from nine pairs of microsatellite loci primers

因数最少(各检测出3个)。各位点的等位基因频率分布不均,部分等位基因呈现高频分布,如GP-08位点的157 bp等位基因频率为0.765 6;而部分等位基

因频率极低,如gpy-20位点的164 bp等位基因频率仅为0.015 6。

表2 32只大熊猫9个微卫星位点的等位基因分布

Table 2 Distribution of alleles at nine microsatellite loci in 32 giant pandas

位点 Locus	等位基因 /bp Allele	等位基因频率 Allele frequency	位点 Locus	等位基因 /bp Allele	等位基因频率 Allele frequency
GPL-60	220	0.250 0	Panda-40	122	0.015 6
	224	0.312 5		126	0.296 9
	228	0.171 9		130	0.625 0
	230	0.031 3		134	0.046 9
	232	0.093 8		156	0.015 6
	236	0.140 6		152	0.093 8
GPL-31	125	0.048 4	GP-901	154	0.562 5
	135	0.016 1		158	0.187 5
	137	0.741 9		160	0.125 0
	139	0.064 5		162	0.031 3
	141	0.032 3	gpy-5	201	0.119 0
	165	0.096 8		205	0.190 5
AY-79	129	0.031 3	209	0.428 6	
	139	0.125 0	213	0.261 9	
	141	0.687 5	gpz-6	202	0.021 7
	147	0.015 6		206	0.521 7
	149	0.015 6		210	0.391 3
155	0.125 0	218	0.065 2		
gpy-20	148	0.671 9	GP-08	155	0.140 6
	161	0.312 5		157	0.765 6
	164	0.015 6		159	0.093 8

表3 9个微卫星位点的遗传参数分析

Table 3 Analysis of genetic information parameters of nine microsatellite loci

位点 Locus	等位基因数 N_a	分型个体数 K	观测杂合度 H_o	期望杂合度 H_e	多态信息含量 PIC	非排除概率 Nonexclusion probability			χ^2	无效等位 基因频率 $F(\text{Null})$
						双亲未知时 单亲 NE-1P	双亲之一 已知时单亲 NE-2P	双亲未知时 亲本对 NE-PP		
GPL-60	6	32	0.938	0.793	0.747	0.606	0.427	0.243	0.495 8	-0.096 7
gpy-5	4	21	0.810	0.714	0.646	0.726	0.556	0.380	0.056 2	-0.074 5
GP-901	5	32	0.656	0.633	0.583	0.779	0.605	0.416	0.690 0	-0.006 0
gpz-6	4	23	0.826	0.583	0.483	0.834	0.715	0.574	0.284 8	-0.197 5
AY-79	6	32	0.500	0.502	0.463	0.867	0.707	0.533	>0.000 1	0.023 2
Panda-40	5	32	0.281	0.527	0.447	0.862	0.738	0.597	0.060 8	0.307 0
GPL-31	6	31	0.355	0.439	0.413	0.897	0.740	0.568	>0.000 1	0.135 2
gpy-20	3	32	0.594	0.458	0.362	0.898	0.811	0.709	0.310 8	-0.142 8
GP-08	3	32	0.406	0.391	0.351	0.926	0.800	0.670	0.207 3	-0.049 6
平均值 Mean	4.667	29.667	0.596	0.560	0.499					

各位点的观测杂合度(H_o)为0.281~0.938,平均为0.596;期望杂合度(H_e)为0.391~0.793,平均为0.560,尽管部分位点(如Panda-40、GPL-31)的观测杂合度低于期望值,但整体而言,群体的平均观测杂合度仍略高于平均期望杂合度。多态信息含量(P_{IC})为0.351~0.747,平均为0.499,其中GPL-60、gpy-5和GP-901为高度多态性($P_{IC} \geq 0.50$),其余为中度多态性($0.25 \leq P_{IC} < 0.50$),表明所选位点整体上具有较好的多态性,适用于群体遗传分析。

按PIC降序排列计算微卫星累积排除概率(CEP)^[24-25],以确定进行准确的亲子鉴定所需的位点数(图4),结果显示:9个高分辨率微卫星位点的双亲未知时单亲累积排除概率(CE-1P)达到0.999 999,双亲之一已知时单亲累积排除概率(CE-2P)均达到0.999 978,双亲未知时亲本对累积排除概率(CE-PP)达到0.999 088,表明本研究筛选的9个微卫星位点用于亲子鉴定结果可靠。

2.4 亲子鉴定

基于前述筛选的9个微卫星标记,利用Cervus 3.0软件对5只子代、4只候选父本和4只母本进行

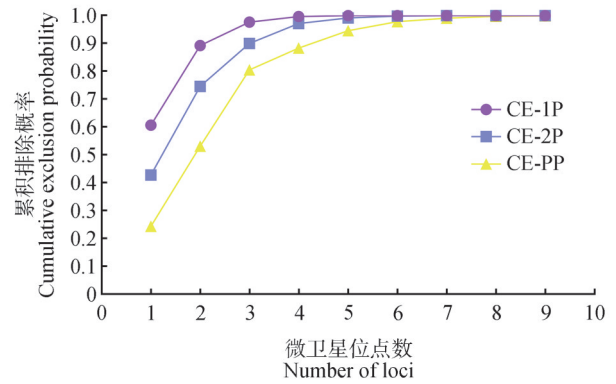


图4 微卫星位点数与累积排除概率的关系

Figure 4 Relationship between microsatellite loci and cumulative exclusion probability

亲子关系鉴定。分析以二联体LOD值为依据,判定亲权关系。结果表明(表4与图5):在母本已知的情况下,子代panda10、panda13与panda14的父本均为panda7;子代panda11与panda8的父本均为panda6。值得注意的是,子代panda12在panda6与panda7两个候选父本间的LOD值均为负值,且置信度较低,未能在此次分析中明确其父本来源。

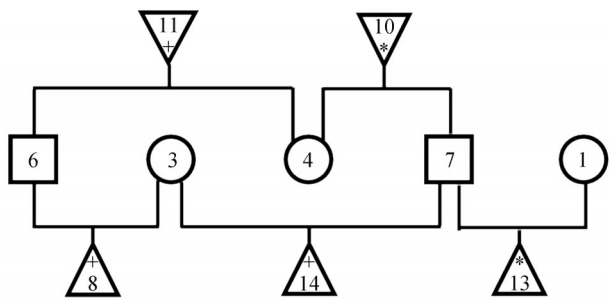
表4 大熊猫亲子鉴定结果

Table 4 Paternity test results for the giant pandas

子代 Offspring	母本 Mother	母本-子代错配位点数 Mother-offspring mismatches	候选父本 Candidate father	父本-子代错配位点数 Father-offspring mismatches	二联体LOD值 Pairwise LOD score	亲权置信度 Parentage confidence
panda10	panda4	0	panda7	0	3.39	*
		0	panda6	1	-3.44	
panda11	panda4	1	panda6	0	8.75×10^{-2}	+
		1	panda7	0	-2.50	
panda12	panda2	0	panda7	0	-1.01	+
		0	panda6	0	-1.20	
panda13	panda1	0	panda7	0	2.47	*
		0	panda6	1	-6.99	
panda8	panda3	0	panda6	0	5.92×10^{-1}	+
		0	panda5	1	-1.36	
		0	panda7	1	-3.81	
		0	panda15	1	-4.77	
panda14	panda3	0	panda7	0	2.23	*
		0	panda15	0	-5.59×10^{-1}	
		0	panda5	0	-1.60	
		0	panda6	0	-4.37	

注: *. 95%置信度;+. 80%置信度。

Note: *. 95% confidence level; +. 80% confidence level.



△. 子代; ○. 母本; □. 候选父本; *. 95% 置信度; +. 80% 置信度。

△. Offspring; ○. Mother; □. Candidate father; *. 95% confidence level; +. 80% confidence level.

图5 基于 Cervus 3.0 鉴定的大熊猫亲缘关系

Figure 5 Pedigree relationship of giant pandas identified by Cervus 3.0

2.5 个体间的遗传距离和聚类分析

为从群体遗传结构角度验证亲子鉴定结果,利

用PopGen32软件计算了32只大熊猫个体间的Nei's遗传距离,并基于该距离矩阵通过iTOL在线工具利用个体邻接法(neighbor joining, NJ)构建聚类树。结果显示(图6,附录1),32只大熊猫的遗传距离为0.0900~2.0760,遗传相似系数介于0.2091~0.9139。其中,panda7和panda14间的遗传距离最小(0.0900),遗传相似系数最高(0.9139),说明两者亲缘关系最近;panda7与panda10亲缘关系也较近,遗传距离为0.0365,遗传相似系数为0.8269。聚类结构显示,在亲子鉴定中被确认为父子关系的个体,如子代panda10、panda13和panda14与其父本panda7,以及子代panda11和panda8与其父本panda6,在进化树上均紧密聚类。这一结果与基于微卫星的亲子鉴定结论相互支持,从群体遗传学层面进一步印证了上述亲子关系的可靠性。

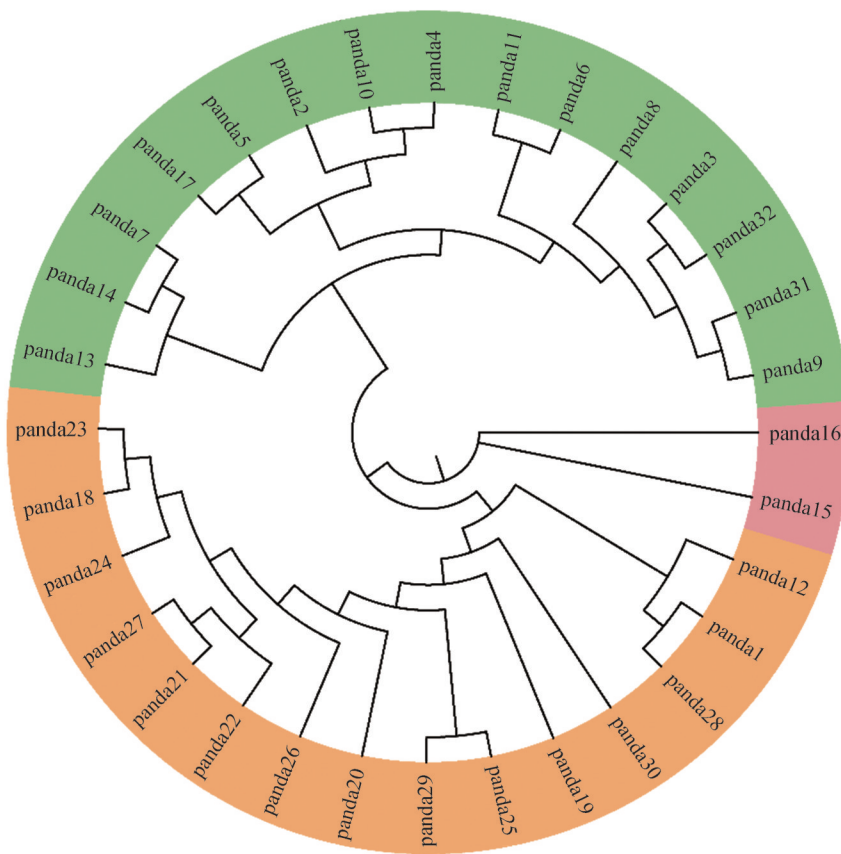


图6 基于Nei's遗传距离的32只大熊猫遗传聚类结果

Figure 6 Genetic clustering results of 32 giant pandas based on Nei's genetic distance

3 讨论与结论

微卫星标记以其多态性好、分辨率高等优点,在

动植物亲缘关系鉴定与群体遗传分析中具有重要价值。近20年来,微卫星标记和非损伤性取样技术的联合使用,极大地推动了大熊猫的保护研究工作。

粪便DNA检测技术已在野生动物个体识别、性别鉴定、亲子鉴定、种群大小估计及遗传多样性评估中得到广泛应用^[18]。然而,粪便样本中宿主基因组DNA含量低,且易受食物残渣和肠道微生物的影响^[15]。因此,提高宿主DNA的提取效率与质量是利用此类样本的关键。本研究通过对QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit试剂盒操作流程进行优化,对粪便样本进行均质化和加热孵育预处理,有效促进了样本的肠上皮细胞裂解与DNA释放。结合RT-qPCR对管家基因(*GAPDH*、*GLUD1*)的定量分析,证实本研究所采用的方法有效地提高了粪便样本中大熊猫基因组DNA的得率,为之后利用野生大熊猫的粪便进行遗传多样性分析提供了可行方案。

相较于其他物种,大熊猫可用的微卫星标记数目仍较为有限。例如,Weng *et al.*^[4]在鞍带石斑鱼(*Epinephelus lanceolatus*)亲子鉴定中使用了11个微卫星位点,Radko *et al.*^[5,26]在猪和犬中分别使用了14个和21个微卫星位点,Nolte *et al.*^[27]在马中使用了17个微卫星标记。尽管在圈养条件下,所有潜在的父本都是可以获得的^[28],但野生大熊猫常面临单亲未知甚至双亲未知的情况,这对野生大熊猫亲子鉴定提出了更高的要求。本研究筛选的9个以四碱基重复为主的高分辨率微卫星位点,其累积排除概率极高(CE-1P达0.999 999,CE-2P达0.999 978,CE-PP达0.999 088),表明该体系足以支持野生大熊猫群体的遗传多样性分析和亲子关系鉴定。

在遗传多样性方面,本研究对楼观台32只大熊猫的分析显示,其平均观测杂合度为0.596,平均期望杂合度为0.560,平均多态信息含量(PIC)为0.499,说明检测的大熊猫群体遗传多样性较高。张志和等^[28]对成都28只大熊猫进行遗传多样性分析发现其平均期望杂合度为0.637,PIC平均值为0.573,Shan *et al.*^[29]对来自5个分布区的240只大熊猫进行研究,发现圈养与野生种群的遗传多样性水平接近,其中来自楼观台的21只大熊猫观测杂合度为0.516,期望杂合度为0.578。需指出的是,本研究与张志和等^[28]及Shan *et al.*^[29]的研究结果存在一定差异,这可能源于不同研究间所用微卫星位点组合、数量及多态性的不同。因此,在跨研究比较时应保持谨慎。尽管如此,本研究结果仍表明,楼观台圈养大熊猫群体遗传多样性保存较好,具有重要的保护价值。在后续研究中,将进一步利用本研究建立

的方法对楼观台大熊猫的群体遗传多样性进行动态评估。

本研究对微卫星位点的质量评估发现,部分位点存在较高的无效等位基因频率(如Panda-40, $F(\text{Null}) = 0.3070$),这可能是导致部分位点观测杂合度低于期望值的原因之一^[30-31]。尽管无效等位基因可能对遗传多样性参数的精确估算产生轻微影响,并在理论上会降低亲子鉴定的排除能力,但本研究9个位点的累积排除概率极高(CE-1P达0.999 999,CE-2P达0.999 978,CE-PP达0.999 088),表明其对最终的亲子鉴定结论影响有限。未来可针对这些位点重新设计引物,以进一步提升系统性能。Slate *et al.*^[32]利用Cervus 3.0软件进行亲子鉴定时发现,根据LOD值计算,设置80%的置信度即可成功评估,且当候选亲本与子代在微卫星位点共享较多的等位基因时,LOD值可能出现负值。基于排除概率的排除法,即当一个位点不匹配时,就可把该候选父本排除^[33],从而确定最有可能的候选父本。然而,在实际检测过程中,由于DNA模板质量、PCR扩增效果、基因分型分辨率及结果判读错误等多种因素影响,均会导致基因位点不匹配^[34-35]。本研究采用了以四碱基重复为主的高分辨率微卫星位点,结合Cervus 3.0分析,设置置信度 $\geq 80\%$,作为判定标准,并对不匹配位点进行重复验证,最终成功明确5只子代的父本来源。系统聚类结果进一步支持了上述亲子关系,表明本研究构建的微卫星体系在大熊猫亲子鉴定中具有较高的实用价值,可为繁育配种方案的制定与近交衰退的预防提供科学依据。

综上所述,本研究通过粪便DNA提取方法,提高了大熊猫粪便中提取的基因组DNA得率;进一步筛选了9个高分辨率的微卫星位点,应用Cervus 3.0软件通过上述微卫星标记完成了32只大熊猫的遗传多样性分析与亲权鉴定,为完善该秦岭大熊猫种群的遗传图谱奠定了基础,也为秦岭大熊猫保护工作提供了科学的理论指导。后续将在现有基础上扩大样本量和地理覆盖范围,提升大熊猫遗传多样性评估的代表性,以期更全面、系统地评估秦岭大熊猫的遗传多样性。

参考文献:

- [1] 金学林. 秦岭大熊猫的保护现状及易地保护研究[J]. 西北大学学报(自然科学版), 2008, 38(2): 248-252.

- JIN X L. The research on present situation and *ex situ* conservation of Qinling Mountain panda *Ailuropoda Melanoleuca qinlingensis* [J]. Journal of Northwest University (Natural Science Edition), 2008, 38(2): 248-252.
- [2] 国家林业和草原局. 全国第四次大熊猫调查报告 [M]. 北京: 科学出版社, 2021:24-28.
National Forestry and Grassland Administration. The 4th national survey report on giant panda in China [M]. Beijing: Science Press, 2021:24-28.
- [3] 闫蔚然. 基于音频的大熊猫交配结果预测[D]. 成都: 四川大学, 2021.
YAN W R. Audio-based prediction of giant panda mating [D]. Chengdu: Sichuan University, 2021.
- [4] WENG Z Y, YANG Y, WANG X, *et al.* Parentage analysis in giant grouper (*Epinephelus lanceolatus*) using microsatellite and SNP markers from genotyping-by-sequencing data [J]. Genes, 2021, 12(7): 1042.
- [5] RADKO A, SMOŁUCHA G, KOSENIUK A. Microsatellite DNA analysis for diversity study, individual identification and parentage control in pig breeds in Poland [J]. Genes, 2021, 12(4): 595.
- [6] SPENCER P B S, WILSON K J, TINSON A. Parentage testing of racing camels (*Camelus dromedarius*) using microsatellite DNA typing [J]. Animal Genetics, 2010, 41(6): 662-665.
- [7] LI Y Z, XU X, SHEN F J, *et al.* Development of new tetranucleotide microsatellite loci and assessment of genetic variation of giant panda in two largest giant panda captive breeding populations [J]. Journal of Zoology, 2010, 282(1): 39-46.
- [8] 沈富军, WATTS P, 张志和, 等. Dynal磁珠富集大熊猫微卫星标记 [J]. 遗传学报, 2005, 32(5): 457-462.
SHEN F J, WATTS P, ZHANG Z H, *et al.* Enrichment of giant panda microsatellite markers using Dynal magnet beads [J]. Acta Genetica Sinica, 2005, 32(5): 457-462.
- [9] HU Y B, ZHAN X J, QI D W, *et al.* Spatial genetic structure and dispersal of giant pandas on a mountain-range scale [J]. Conservation Genetics, 2010, 11(6): 2145-2155.
- [10] WU H, ZHAN X J, ZHANG Z J, *et al.* Thirty-three microsatellite loci for noninvasive genetic studies of the giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*) [J]. Conservation Genetics, 2009, 10(3): 649-652.
- [11] 张艺琼. 四川美姑大风顶国家级自然保护区大熊猫遗传多样性及栖息地适宜性评价研究[D]. 南充: 西华师范大学, 2024.
ZHANG Y Q. Study on the genetic diversity of giant pandas and habitat suitability assessment in Meigu Dafengding National Nature Reserve, Sichuan, China [D]. Nanchong: China West Normal University, 2024.
- [12] 李春海. 圈养大熊猫在遗传水平的局部适应性分析研究 [D]. 绵阳: 西南科技大学, 2024.
LI C H. Analysis of genetic adaptability in captive giant pandas [D]. Mianyang: Southwest University of Science and Technology, 2024.
- [13] 黄纬杰, 郭向召, 张子豪, 等. 草鱼全基因组微卫星特征分析与亲子鉴定 [J]. 水产学报, 2022, 46(2): 161-172.
HUANG W J, GUO X Z, ZHANG Z H, *et al.* Analysis of microsatellite in the entire grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) genome and the application in parentage identification [J]. Journal of Fisheries of China, 2022, 46(2): 161-172.
- [14] 刘旭, 丁由中. 分子生物学技术应用于野生动物保护及扩散研究概况 [J]. 野生动物学报, 2019, 40(2): 497-501.
LIU X, DING Y Z. The application of molecular biological techniques to wildlife conservation and studies of wildlife dispersal [J]. Chinese Journal of Wildlife, 2019, 40(2): 497-501.
- [15] 王聪. 基于粪便DNA的川西猕猴个体识别微卫星位点筛选及其遗传多样性研究 [D]. 雅安: 四川农业大学, 2021.
WANG C. Fecal DNA-based selection of individual recognition microsatellite loci and genetic diversity in Sichuan macaques [D]. Ya'an: Sichuan Agricultural University, 2021.
- [16] 王小琪, 段子渊. 动物粪便中分子遗传信息的应用 [J]. 四川动物, 2022, 41(6): 711-720.
WANG X Q, DUAN Z Y. Application of molecular genetic information in animal feces [J]. Sichuan Journal of Zoology, 2022, 41(6): 711-720.
- [17] 黄乃莹, 刘艳华. 分子粪便学在野生动物食性研究中的应用 [J]. 野生动物学报, 2022, 43(1): 266-269.
HUANG N Y, LIU Y H. Application of molecular scatology in the study of wild animal feeding habits [J]. Chinese Journal of Wildlife, 2022, 43(1): 266-269.
- [18] 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.
ZHANG H. The individual identity, parentage analysis and home range determination of wapiti based on faeces molecular biology [D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2010.
- [19] 寇洁, 李严, 王鹏, 等. 大熊猫遗传多样性评估的微卫星分型体系优化 [J]. 遗传, 2022, 44(3): 253-266.
KOU J, LI Y, WANG P, *et al.* Optimization of microsatellite genotyping system used for genetic diversity evaluation of *Ailuropoda melanoleuca* [J]. Hereditas (Beijing), 2022, 44(3): 253-266.
- [20] HUANG J, LI Y Z, DU L M, *et al.* Genome-wide survey and analysis of microsatellites in giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*), with a focus on the applications of a novel microsatellite marker system [J]. BMC Genomics, 2015, 16(1): 61.
- [21] 张亚平, 王文, 宿兵, 等. 大熊猫微卫星DNA的筛选及其应用 [J]. 动物学研究, 1995, 16(4): 301-306.
ZHANG Y P, WANG W, SU B, *et al.* Microsatellite DNAs and kinship identification of giant panda [J]. Zoological Research, 1995, 16(4): 301-306.
- [22] MARSHALL T C, SLATE J, KRUK L E B, *et al.* Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations [J]. Molecular Ecology, 1998, 7(5): 639-655.
- [23] YEH F C, YANG R C, BOYLE T, *et al.* POPGENE, version 1.32: The user friendly software for population genetic analysis

- [J]. Molecular biology and biotechnology centre, University of Alberta, Edmonton, AB, Canada, 1999.
- [24] ZHAO X, QIU Q G, LI C, *et al.* Genome-based development of 15 microsatellite markers in fluorescent multiplexes for parentage testing in captive tigers [J]. PeerJ, 2020, 8: e8939.
- [25] JAMIESON A, TAYLOR S C S. Comparisons of three probability formulae for parentage exclusion [J]. Animal Genetics, 1997, 28(6): 397-400.
- [26] RADKO A, PODBIELSKA A. Microsatellite DNA analysis of genetic diversity and parentage testing in the popular dog breeds in Poland [J]. Genes, 2021, 12(4): 485.
- [27] NOLTE W, ALKHODER H, WOBBE M, *et al.* Replacement of microsatellite markers by imputed medium-density SNP arrays for parentage control in German warmblood horses [J]. Journal of Applied Genetics, 2022, 63(4): 783-792.
- [28] 张志和, 沈富军, 孙姗, 等. 应用微卫星分型方法进行大熊猫猫父亲鉴定 [J]. 遗传, 2003, 25(5): 504-510.
ZHANG Z H, SHEN F J, SUN S, *et al.* Paternity assignment of giant panda by microsatellite genotyping [J]. Hereditas (beijing), 2003, 25(5): 504-510.
- [29] SHAN L, HU Y B, ZHU L F, *et al.* Large-scale genetic survey provides insights into the captive management and reintroduction of giant pandas [J]. Molecular Biology and Evolution, 2014, 31(10): 2663-2671.
- [30] CHAPUIS M P, ESTOUP A. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation [J]. Molecular Biology and Evolution, 2007, 24(3): 621-631.
- [31] DAKIN E E, AVISE J C. Microsatellite null alleles in parentage analysis [J]. Heredity, 2004, 93(5): 504-509.
- [32] SLATE J, MARSHALL T, PEMBERTON J. A retrospective assessment of the accuracy of the paternity inference program Cervus [J]. Molecular Ecology, 2000, 9(6): 801-808.
- [33] JONES A G, ARDREN W R. Methods of parentage analysis in natural populations [J]. Molecular Ecology, 2003, 12(10): 2511-2523.
- [34] 顾颖, 李超, 鲁翠云, 等. 建鲤(*Cyprinus carpio* var. Jian)微卫星DNA亲权鉴定 [J]. 遗传, 2012, 34(11): 1447-1455.
GU Y, LI C, LU C Y, *et al.* Microsatellite markers for parentage identification in Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian) [J]. Hereditas (Beijing), 2012, 34(11): 1447-1455.
- [35] 范嗣刚, 黄皓, 王鹏飞, 等. 基于微卫星标记的花鲈亲子鉴定技术 [J]. 广东海洋大学学报, 2023, 43(5): 26-33.
FAN S G, HUANG H, WANG P F, *et al.* Paternity test technology of *Lateolabrax maculatus* based on microsatellite markers [J]. Journal of Guangdong Ocean University, 2023, 43(5): 26-33.

附录 Supplementary Material

附录1 32只大熊猫的遗传距离与遗传相似度

Appendix 1 Genetic distance and genetic similarity of 32 giant pandas

<https://dx.doi.org/10.12375/ysdwxb.202411039>