



# 我国圈养和野生东北虎种群 线粒体基因组遗传多样性的比较研究

褚佳宁<sup>1</sup>, 徐海涛<sup>2</sup>, 何志健<sup>1</sup>, 杨金城<sup>1</sup>, 周永恒<sup>1</sup>, 刘博洋<sup>1</sup>,  
崔靛玉<sup>1</sup>, 高雨薇<sup>1</sup>, 刘丹<sup>2</sup>, 徐艳春<sup>1</sup>, 姜广顺<sup>1\*</sup>, 杨淑慧<sup>1\*</sup>

(1. 东北林业大学野生动物与自然保护地学院, 哈尔滨, 150040;  
2. 中国横道河子猫科动物饲养繁育中心, 牡丹江, 157000)

## 稿件运行过程

收稿日期: 2023-05-14  
修回日期: 2023-11-03



**关键词:** 东北虎;  
遗传拯救;  
线粒体基因组;  
粪便DNA;  
遗传多样性

**Key words:** Amur tiger (*Panthera tigris altaica*);  
Genetic rescue;  
Mitochondrial genome;  
Fecal DNA;  
Genetic diversity

中图分类号: Q953

文献标识码: A

文章编号:

2310-1490(2024)-02-0231-11

DOI: 10.12375/ysdwx.20240201

## 摘要

东北虎(*Panthera tigris altaica*)是体型最大的猫科(Felidae)动物之一,是极具代表性的珍稀野生动物。现有研究表明,我国野生东北虎种群遗传多样性较低、近交水平较高。尽管目前我国野生东北虎的数量在逐步增长,但通过人工干预来提高野生东北虎的遗传多样性会更利于其数量的恢复,通过野化放归进行遗传拯救是一种关键策略,但实施遗传拯救之前,必须确定圈养个体与现存野生个体间的遗传关系。采用粪便DNA的高通量测序数据组装了51只横道河子圈养东北虎和13只完达山、老爷岭等地的野生东北虎的线粒体基因组,分析两者之间的关系,评估线粒体基因组的遗传多样性。结果表明:圈养东北虎的遗传多样性高于野生种群,所有遗传变异均为无害。部分圈养个体与野生种群同属一个进化支,且具有野生种群所不包含的遗传变异,可用于实施遗传拯救。此外,圈养种群存在显著的遗传分化,一个与当前野生种群关系很远的分支可能代表未知的地理种群,因此,建议对该远缘分支开展野外来源的追溯,确定其谱系地理学地位和保护价值,使其成为恢复野外历史遗传多样性的后备资源。

## A Comparative Study on Mitochondrial Genetic Diversity Between Captive and Wild Amur Tigers in China

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(32170517)

第一作者简介: 褚佳宁(1998—),男,硕士研究生;主要从事动物学与保护生物学研究。E-mail:365202161@qq.com

\*通信作者: 姜广顺, E-mail:jgshun@126.com; 杨淑慧, E-mail:474568251@qq.com

CHU Jianing<sup>1</sup>, XU Haitao<sup>2</sup>, HE Zhijian<sup>1</sup>, YANG Jincheng<sup>1</sup>, ZHOU Yongheng<sup>1</sup>, LIU Boyang<sup>1</sup>,  
CUI Liangyu<sup>1</sup>, GAO Yuwei<sup>1</sup>, LIU Dan<sup>2</sup>, XU Yanchun<sup>1</sup>, JIANG Guangshun<sup>1\*</sup>, YANG Shuhui<sup>1\*</sup>

(1. College of Wildlife and Protected Area, Northeast Forestry University, Harbin, 150040, China;  
2. China Hengdaohezi Feline Breeding and Breeding Center, Mudanjiang, 157000, China)

**Abstract:** The Amur tiger (*Panthera tigris altaica*), revered as one of the largest feline species (Felidae), stands as a representative of rare wild species. Extant research underscores the perilous state of genetic diversity in wild Amur tiger populations in China, accompanied by elevated levels of inbreeding. Despite the gradual increasing in the wild population of Amur tiger in China, the optimization of genetic diversity necessitates deliberate artificial interventions to more effectively facilitate their population recovery. Among the viable options, genetic rescue through rewilding was a pivotal strategy for bolstering the genetic health of this iconic species. Prior to initiating such genetic interventions, a meticulous examination of the genetic relationships between captive and extant wild individuals became imperative. This study leveraged high-throughput sequencing data from fecal DNA to assemble mitochondrial genomes of 51 captive Amur tigers in Hengdaohezi and 13 wild counterparts in Wandashan and Laoyeling. Through comprehensive analysis, the genetic relationships were elucidated, and a preliminary assessment of mitochondrial genome diversity was conducted. The findings revealed a higher genetic diversity in captive Amur tigers compared to their wild counterparts, with all genetic variations deemed benign. Significantly, certain captive individuals aligned with specific evolutionary branches within the wild population, harboring unique genetic variations absent in their wild counterparts-rendering them promising candidates for genetic rescue initiatives. Furthermore, distinct genetic differentiations were identified within captive populations, notably a branch was distant from the current wild population, indicating the existence of a potential unknown geographical population. Consequently, we recommend an exhaustive exploration to trace the origins of this remote branch, determine its phylogeographic status, assess its conservation significance, and position it as a reserve resource for reinstating historical genetic diversity in the wild.

东北虎(*Panthera tigris altaica*)在维持东北亚森林生物系统的稳定性和完整性中扮演着重要角色。人口的增长和人类活动的日益增强、扩展,导致野生东北虎的栖息地遭到严重破坏<sup>[1]</sup>,使之持续缩小和破碎化<sup>[2]</sup>,严重影响了野生东北虎的生存。此外,气候变化和环境污染等直接或间接造成的猎物数量下降,也给东北虎的生存带来了很大挑战<sup>[3]</sup>。因此,东北虎与其他虎亚种一起在国际自然保护联盟红色名录(IUCN Red List)中被列为濒危级(EN),同时被濒危野生动植物种国际贸易公约(CITES)列为附录 I 物种。

目前我国境内野生东北虎包括4个相互隔离的小种群<sup>[4]</sup>,各个小种群之间缺乏可用的生态廊道,无法进行自然的基因交流,发生了较为严重的近交,导致野生东北虎种群遗传多样性较低<sup>[5]</sup>。遗传多样性对于野生动物适应环境、抵御疾病等都具有极为重要的意义<sup>[6-7]</sup>。当小种群无法自我维持遗传多样性

时,就需要通过人工辅助引入外源基因来提高遗传多样性,这被称为遗传拯救<sup>[8]</sup>。目前野生东北虎的处境需要开展人工辅助基因交流:一方面,通过建设生态廊道使不同种群之间得以自然交流<sup>[9]</sup>;另一方面,将人工繁育的东北虎野化放归,参与野生种群的繁殖,达到提升遗传多样性的目的<sup>[10]</sup>。野化放归的策略首先要基于充分的遗传学分析,从圈养种群中选择与野生种群同属一个进化分支且能提高野生种群遗传多样性的个体,进行野化训练并放归。在提高遗传多样性的同时应当权衡遗传拯救的收益和风险,既要避免远交衰退的产生还要避免有害基因的引入。本研究所考察的圈养种群来自国家东北虎种源基地横道河子猫科动物饲养繁育中心,该基地先后从多国引进东北虎种源,目前已饲养超过1 000只东北虎,这一庞大的数量足以支撑野化放归项目。本研究利用东北虎粪便提取DNA,并通过高通量测序获取东北虎线粒体全基因组,用于圈养种群与野

生种群遗传多样性评估和遗传关系的比较,从母系遗传层面为圈养东北虎野化放归个体的遴选提供支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 粪便采集与DNA提取

共采集64份东北虎粪便样品,包括来自中国横道河子猫科动物饲养繁育中心的51只圈养东北虎和13只完达山、老爷岭等地的野生东北虎。13个野生东北虎的粪便样本分别取自吉林省珲春市(8个)、黑龙江省鹤岗市萝北县(2个)、吉林省敦化市(1个)、吉林省舒兰市(1个)和黑龙江省东宁市(1个)<sup>[11]</sup>。野生东北虎的粪便样本均通过扩增线粒体的一个271 bp的细胞色素*b*基因片段进行物种确认;并选择18个微卫星标记进行基因分析和个体鉴定<sup>[5]</sup>。采用本团队创建的粪便DNA富集方法(per-extraction enrichment using SDS, PEERS, 专利号:

CN113186185A)对粪便进行预处理,通过向粪便溶解液中加入终浓度为5%的SDS,破坏东北虎的细胞,同时保持微生物的完整性,从而优先释放东北虎的DNA。离心后采用Axygen Multisource Genomic DNA(Axygen,美国)试剂盒提取上清液DNA,即得到富集的东北虎总DNA。

### 1.2 DNA质检

获得的粪便DNA中只有宿主DNA占比足够高才适合进行高通量测序。因此,分别以东北虎核基因*GAPDH*(nuDNA,NCBI序列号:NC056666.1)和线粒体基因*Cyt b*(mtDNA,NCBI序列号:KF297576.1)为模板,设计定量PCR引物,用于测定总DNA中二者的拷贝数;同时在细菌的16S rRNA基因上设计1对通用引物,用于测定细菌DNA(bDNA)的拷贝数。当mtDNA与bDNA的CT值差值小于3、bDNA的CT值大于10、nuDNA的CT值小于25时用于高通量测序(表1)。

表1 检测东北虎粪便宿主DNA拷贝数的PCR引物

Tab. 1 PCR primers for detection of host DNA copy number in Amur tiger feces

基因片段 Gene segment	引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence	退火温度 T <sub>m</sub> /°C
16S rRNA	B1	5'-CATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATC-3'	56
	B2	5'-CTACGGCTACCTTGTACGACTTC-3'	
<i>Cyt b</i>	M1	5'-TGTTTCGACCGCTAAGCCAA-3'	56
	M2	5'-GCCGATGGCAATAAAGGGGT-3'	
<i>GAPDH</i>	N1	5'-TGGAGACAAGCCGAAAGCTC-3'	56
	N2	5'-TGGAAAGCCCATCACCATCTT-3'	

荧光定量PCR体系10.0 μL:1.0 μL DNA提取液,5.0 μL TB Green Premix ExTaq II酶(TaKaRa,大连),浓度为10 μmol/L的上、下游引物各0.4 μL和ddH<sub>2</sub>O 3.2 μL。三对引物采用相同的反应程序:95 °C预变性30 s;95 °C变性5 s,58 °C退火34 s,72 °C延伸30 s,40个循环;95 °C变性10 s+65 °C退火5 s+95 °C延伸15 s。利用9700型PCR扩增仪(GeneAmp,美国)进行扩增反应。

### 1.3 高通量测序及数据处理

合格的DNA在MGISEQ-2000测序平台(华大智造,中国)进行高通量测序。下机数据使用FastQC进行可视化质量查验;使用Trimmomatic去除低质量序列和接头;用BWA(Burrow-Wheeler Aligner)完成线粒体数据的比对;用SAMtools将测序数据中的

read排序整齐,并用GATK去除重复序列,计算测序覆盖度与测序深度。

### 1.4 线粒体组装与遗传多样性分析

使用NOVOPlasty将整理后的序列组装成完整的mtDNA基因组。组装好的mtDNA用MAFFT进行序列比对,提取线粒体的D-loop区、2个编码核糖体核酸的基因(12S rRNA和16S rRNA)和13个编码蛋白质的基因,用于不同区域的分析。使用DnaSP6计算核苷酸多样性( $P_i$ )与单倍型多样性( $H_d$ ),并使用POPART绘制单倍型网络。用VCFtools计算遗传分化系数( $F_{ST}$ ),基于最大似然法(ML)构建的进化树和遗传距离的计算由MEGA 11完成。

### 1.5 注释突变位点

选用东北虎线粒体全基因组(NCBI序列号:

KF297576.1)作为参考序列,使用GATK完成SNP位点的检测和筛选,检测得到的SNP位点使用软件ANNOVAR进行注释和分析。在ANNOVAR中的grantham.matrix矩阵下,对所有突变进行Grantham评分,评估突变是否有害。评估主要基于氨基酸的物理/化学组成,一般认为,Grantham评分 $\geq 150$ 的突变是有害的,评分 $< 150$ 的突变是良性的。

## 2 结果

### 2.1 粪便DNA质量与测序质量评估

所有粪便DNA的质量浓度都分布在12.5~47.0 ng/ $\mu\text{L}$ ,均满足高通量测序要求。测序数据中质量达到 $Q_{20}$ 的碱基在95%以上,且碱基质量平均值波动较小,表明测序质量足够高。碱基分离程度均匀,序列中GC含量的实际分布与理论分布接近。平均测序覆盖度均为100%,表明数据质量可靠。

### 2.2 组装线粒体基因组

所有个体的mtDNA均被完整组装,其中D-loop区中POLYC片段的长度在个体间变化较大,具体数目无法通过read比对来确定,属于测量不精准区域,故取所有个体中最短的长度作为POLYC片段的长度,因而D-loop区的长度为1 180 bp,线粒体基因总长度为16 629 bp。其他各个基因区段均未见插入和缺失的碱基(表2)。

表3 东北虎线粒体全基因组的多样性

Tab. 3 Diversity of whole mitochondrial genome of Amur tiger

东北虎种群 Amur tiger population	个体数量 Number	片段长度( $N_s$ ) Fragment length	突变位点数量( $N_v$ ) Number of sites	核苷酸多样性( $P_i$ ) Nucleotide diversity	单倍型数量( $N_h$ ) Number of haplotypes	单倍型多样性( $H_d$ ) Haplotype diversity
圈养 Captive	51	16 629	39	0.001 05	7	0.711
野生 Wild	13	16 629	3	0.000 07	2	0.385
总体 All	64	16 629	41	0.001 14	9	0.793

基于线粒体全基因序列,分别绘制圈养个体、野生个体和全部个体的核苷酸多样性分布图(图1)。总体来看,线粒体基因组上核苷酸多样性的分布以圈养种群为主导(图1A);圈养种群的核苷酸多样性(图1B)要远高于野生种群(图1C),但在不同区域间,二者核苷酸多样性差异较大,圈养虎在碱基序号4 900~8 600、10 300~13 200和13 600~16 000三个区域较高(图1B),而野生虎主要表现在2 100~2 500、8 700~9 100和15 100~15 500三个区域(图1C)。

表2 东北虎线粒体基因组16个基因区段的长度

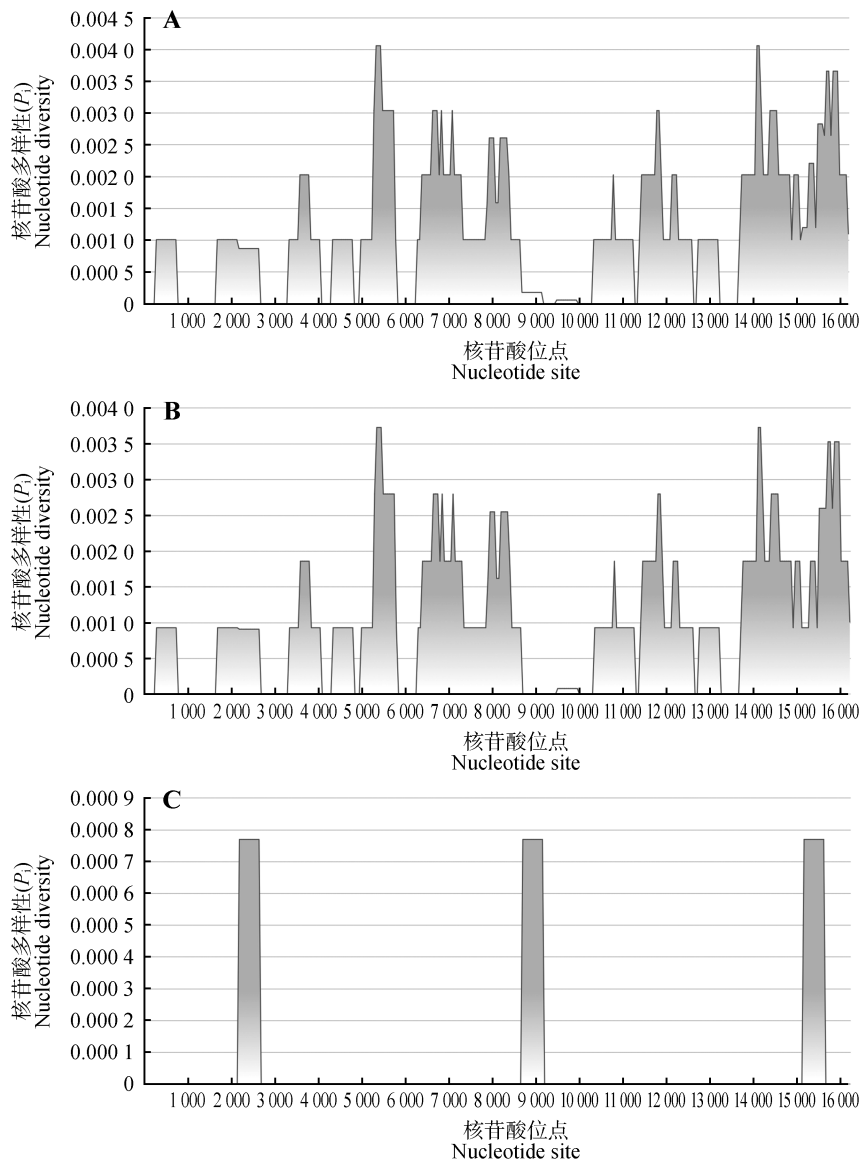
Tab. 2 The length of the 16 gene segments of the Amur tiger mitochondrial genome

基因/区段名称 Gene/Region name	基因长度/bp Gene length	基因/区段名称 Gene/Region name	基因长度/bp Gene length
12S rRNA	960	COX3	784
16S rRNA	1 575	ND3	347
ND1	956	ND4L	297
ND2	1 042	ND4	1 378
COX1	1 545	ND5	1 821
COX2	684	ND6	528
ATP8	204	Cyt b	1 140
ATP6	681	D-loop	1 180

### 2.3 核苷酸多样性与单倍型多样性

在64只东北虎的线粒体基因组中共鉴定到41个多态位点和9种单倍型。圈养东北虎的多态位点为39个,其中单次突变位点1个,简约信息位点38个。野生东北虎的多态位点为3个,全部是简约信息位点。圈养和野生东北虎单倍型数量分别为7、2种,二者之间不存在共享单倍型。圈养种群和野生种群的单倍型多样性分别为0.711和0.385,核苷酸多样性分别为0.001 05和0.000 07。对于所有样本,单倍型多样性为0.793,核苷酸多样性为0.001 14。总体而言,圈养种群的核苷酸多样性和单倍型多样性要远高于野生种群的多样性(表3)。

为了进一步分析线粒体基因组上不同功能区域的多样性水平,将线粒体基因组分成6个功能区:ND编码区、ATP编码区、COX编码区、Cyt b编码区、D-loop区和rRNA编码区。各个区域的长度为其所包含的基因长度之和,其中ND4L基因与ND4基因存在7个重叠碱基,ND5基因与ND6基因存在17个重叠碱基,ATP8基因与ATP6基因存在43个重叠碱基,故ND区与ATP区的长度分别为6 345 bp与842 bp。



A. 圈养和野生东北虎总体; B. 圈养东北虎; C. 野生东北虎。

A. Total tigers; B. Captive tigers; C. Wild tigers.

图1 圈养和野生东北虎线粒体基因组核苷酸多样性分布

Fig. 1 Distribution of nucleotide diversity of mitochondrial genome of captive and wild Amur tigers

圈养种群的 *Cyt b* 基因具有最高的核苷酸多样性(0.002 04); rRNA 编码区的核苷酸多样性最低(0.000 55); D-loop 区的单倍型多样性最高, 达到0.623; 编码细胞色素 C 氧化酶的 COX 区和 *Cyt b* 基因的单倍型多样性最低, 均为0.466。野生种群中 D-loop 控制区的核苷酸多样性和单倍型多样性最高, 分别为0.000 40 和 0.462; 而编码 NADH 脱氢酶的 ND 区与编码 ATP 合成酶的 ATP 区核苷酸多样性和单倍型多样性均为 0, 表现出极低的多样性(表4)。

圈养种群和野生种群共检测到9种单倍型(表

5)。基于单倍型序列绘制的单倍型网络显示, 东北虎的单倍型可以分为两个大组, 一组由 Hap\_2 和 Hap\_3 组成, 另一组由其他单倍型组成(图2)。两组之间的核苷酸差异远大于组内, 遗传分化系数( $F_{ST}$ )为0.061。野生种群的单倍型全部包含在第2组中, 且与圈养种群单倍型的差异只有1或2个核苷酸。单倍型的分化主要发生在圈养种群中。

#### 2.4 野生和圈养东北虎的母系遗传关系

9种单倍型之间的 Nei 氏遗传距离在0.000 06~0.002 35, 平均为0.000 76。其中, Hap\_3 与 Hap\_9 的遗传距离最大, 为0.002 35; Hap\_1 与 Hap\_4、

Hap\_7、Hap\_8, Hap\_2 与 Hap\_3, Hap\_5 与 Hap\_4、Hap\_7, Hap\_6 与 Hap\_8 之间的遗传距离最小, 均为 0.000 06。圈养种群与野生种群单倍型 Hap\_8 遗传距离最近的为单倍型 Hap\_1 和 Hap\_6, 最远的单倍型为 Hap\_3; 与野生单倍型 Hap\_9 遗传距离最近的为 Hap\_1, 最远的为 Hap\_3(表6)。

表4 圈养和野生东北虎种群线粒体基因组6个功能区多样性

Tab. 4 Diversity of six functional regions of the mitochondrial genome of captive and wild Amur tigers

东北虎种群 Amur tiger population	功能区 Region	片段长度( $N_s$ ) Fragment length	突变位点数量( $N_s$ ) Number of sites	核苷酸多样性( $P_i$ ) Nucleotide diversity	单倍型数量( $N_h$ ) Number of haplotypes	单倍型多样性( $H_d$ ) Haplotype diversity
圈养 Captive	ND	6 345	12	0.000 75	5	0.517
	ATP	842	3	0.001 52	3	0.526
	COX	3 013	8	0.001 24	2	0.466
	<i>Cyt b</i>	1 140	5	0.002 04	2	0.466
	D-loop	1 180	5	0.001 84	3	0.623
	rRNA	2 535	3	0.000 55	3	0.479
野生 Wild	ND	6 345	0	0	1	0
	ATP	842	0	0	1	0
	COX	3 013	1	0.000 13	2	0.385
	<i>Cyt b</i>	1 140	1	0.000 34	2	0.385
	D-loop	1 180	1	0.000 40	2	0.462
	rRNA	2 535	1	0.000 15	2	0.385

表5 圈养种群和野生种群单倍型序列

Tab. 5 Haplotype sequences of captive and wild Amur tigers

东北虎种群 Amur tiger population	单倍型 Haplotype	单倍型序列(5'→3') Haplotype sequence (5'→3')
圈养 Captive	Hap_1	AGGTACTCACCTAAAGTTTACTAATCCTACTGGGCACTCAC
	Hap_2	GAACGTCTGTTCCGGGATCCACCGCCTTCGTCAAATATTTGT
	Hap_3	GAACGTCTGTTCCGGGATCCACCGCCTTCGTCAAATATATGT
	Hap_4	AGGTACTCACCTAAAGCTTACTAATCCTACTGGGCACTCAC
	Hap_5	AGGTACTCACCTAAAGCTTACTAATCCTACTGGGCACACAC
	Hap_6	AGATACTCACCTAAAGTTTATTAATCCTACTGGGCACTCAC
	Hap_7	AGGTACTCACCTAAAGTTTACTAATCCTACTGGGCACACAC
野生 Wild	Hap_8	AGATACTCACCTAAAGTTTACTAATCCTACTGGGCACTCAC
	Hap_9	AGGTACTCACCTAAAGTTTGCTAATCCTACTGGGCGCTCAC

以家猫 (*Felis catus*)、华南虎 (*Panthera tigris amoyensis*)、虎指名亚种 (*P. t. tigris*) 为外群, 在东北虎个体的线粒体全基因构建的 ML 进化树上, 外群均位于东北虎的外侧, 说明该系统进化树的结构正确。东北虎分为两个大的分支, 其中携带 Hap\_2 与 Hap\_3 的个体聚为第 1 个分支, 其他个体聚为第 2 个

分支。在第 2 个分支中, 携带 Hap\_8 的野生个体与携带 Hap\_6 的圈养个体聚为一个小支, 携带 Hap\_9 的野生个体与携带 Hap\_1 的圈养个体聚为一个小支 (图 3)。这表明所研究的野生个体与圈养个体之间存在很近的进化关系, 这一进化关系完全印证了单倍型网络与遗传距离计算的结果。

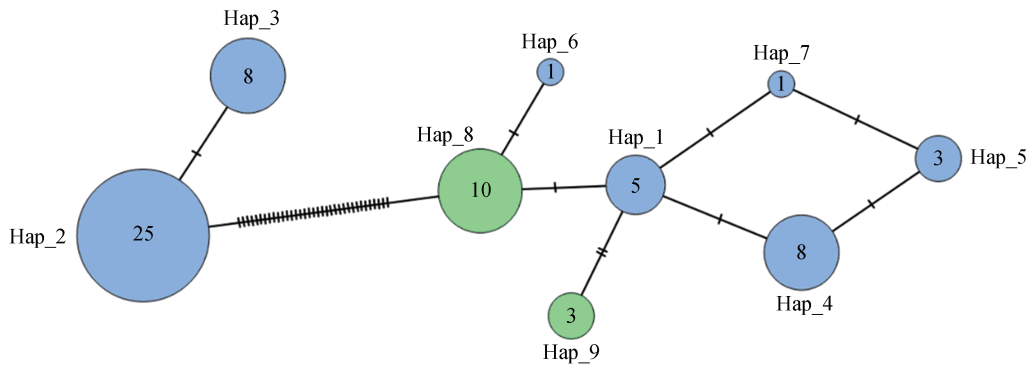
表6 东北虎种群中9种单倍型间的遗传距离

Tab. 6 Genetic distances among nine haplotypes of Amur tigers

单倍型 Haplotype	Hap_1	Hap_2	Hap_3	Hap_4	Hap_5	Hap_6	Hap_7	Hap_8*	Hap_9*
Hap_1									
Hap_2	0.002 17								
Hap_3	0.002 23	0.000 06							
Hap_4	0.000 06	0.002 23	0.002 29						
Hap_5	0.000 12	0.002 29	0.002 23	0.000 06					
Hap_6	0.000 12	0.002 17	0.002 23	0.000 18	0.000 24				
Hap_7	0.000 06	0.002 23	0.002 17	0.000 12	0.000 06	0.000 18			
Hap_8*	0.000 06	0.002 11	0.002 17	0.000 12	0.000 18	0.000 06	0.000 12		
Hap_9*	0.000 12	0.002 29	0.002 35	0.000 18	0.000 24	0.000 24	0.000 18	0.000 18	

注：\*表示野生种群的单倍型。

Note: \* Represents the haplotype of wild population.



蓝色代表圈养个体,绿色代表野生个体,圈内数字代表个体数量,单倍型连线上的短横表示差异碱基。

Blue circles represent captive tigers, green ones represent wild tigers, the numbers represent the number of individuals, and short dashes on lines between haplotypes represent different nucleotides.

图2 东北虎线粒体基因组的单倍型网络

Fig. 2 Haplotype network of mitochondrial genome of captive and wild Amur tigers

### 2.5 线粒体基因组突变的有害性

以东北虎线粒体基因组(NCBI序列号:KF297576.1)为参照,64只个体共筛选得到493个SNP位点。493个SNP位点的Grantham评分最大值为34.67,最小值为2.00,意味着所有突变均为非有害突变(图4)。

## 3 讨论

### 3.1 粪便DNA在线粒体基因组重测序中的可用性

线粒体DNA可以反映母系的遗传变异<sup>[12]</sup>,由于其具有高拷贝、高突变率的特点<sup>[13]</sup>,被广泛应用于系统发育和地理学<sup>[14]</sup>、群体遗传学<sup>[15]</sup>及医学研究<sup>[16]</sup>。粪便是较易获得的非损伤性材料,可从中获得DNA用于分子生态学和遗传学分析<sup>[17-18]</sup>。但是,粪便中含有极其丰富的微生物和少量的宿主肠上皮细

胞<sup>[19]</sup>,其DNA的质量和可用性受到宿主消化能力、摄入食物、DNA降解程度和粪便采集时机等影响<sup>[20-21]</sup>,因此从粪便中获取高质量的宿主DNA始终是个技术难点,好在粪便DNA中的mtDNA拷贝数高于核DNA,通过高通量测序数据更容易实现基因组的组装<sup>[22]</sup>。本研究进行了有益的尝试,从所有样品的粪便DNA测序数据中成功组装了完整的线粒体基因组,且平均覆盖度均达到100%,达到了血液等高通量材料组装的效果<sup>[23]</sup>。

日后可凭借本试验的高通量测序数据以及组装成功的完整线粒体基因组开展后续分析,这相较于传统的局部片段或某一基因的分析更加全面、信息量更大<sup>[23-24]</sup>。本研究的DNA提取、质检、测序和线粒体基因组的组装方法等可为将来其他物种基于粪便的研究提供一定经验。

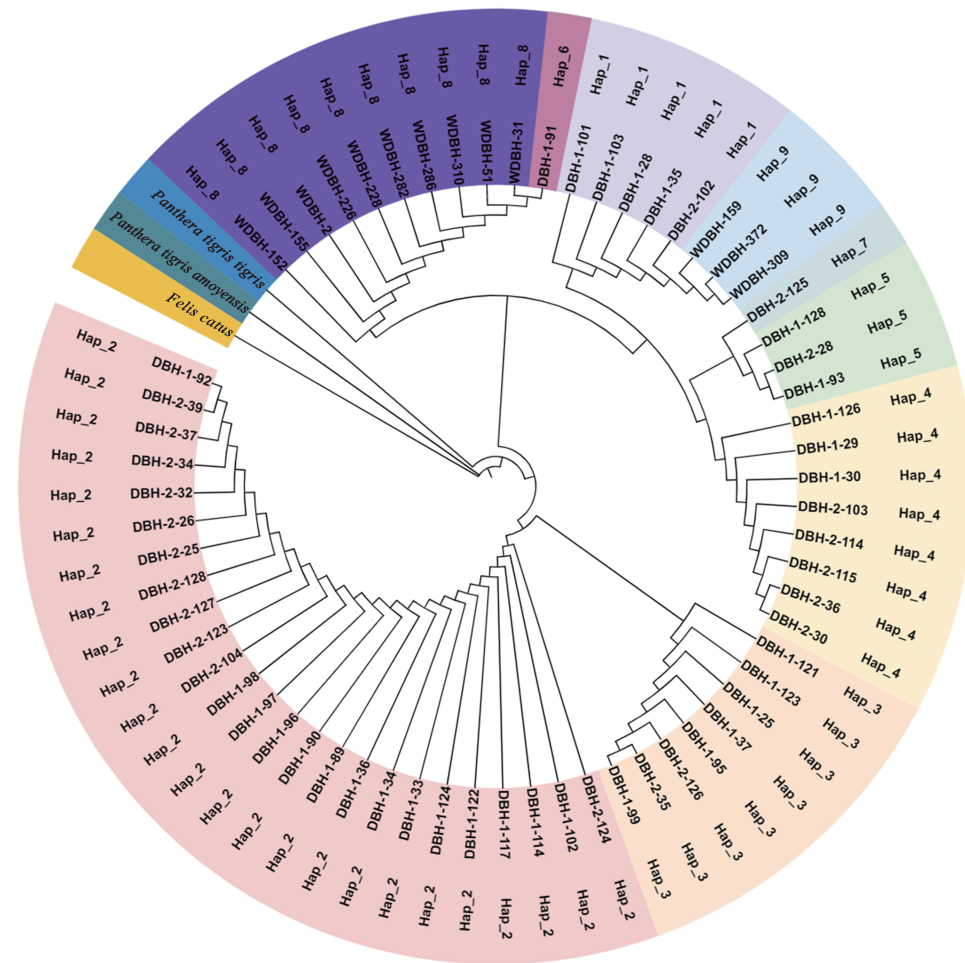


图3 基于ML法构建的东北虎个体线粒体基因组系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of mitochondrial genomes of Amur tigers constructed based on ML method

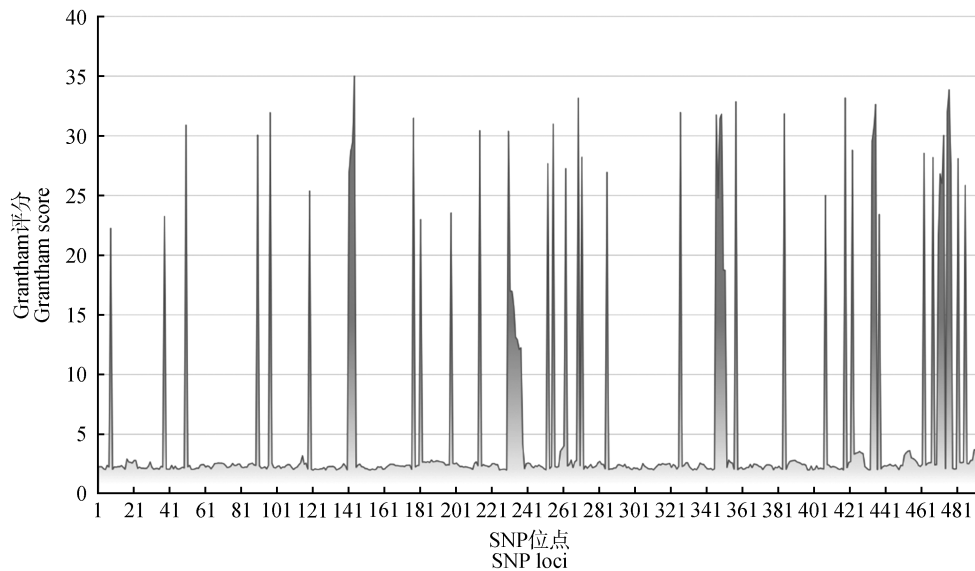


图4 东北虎线粒体基因组 SNP 位点的 Grantham 评分分布

Fig. 4 Grantham score distribution of SNP loci on mitochondrial genome of Amur tigers

### 3.2 圈养和野生东北虎的线粒体基因组多样性

我国动物园饲养东北虎的历史可以追溯到新中国成立初期,如1952—1959年,哈尔滨动物园共收幼虎99只,平均每年12只<sup>[25]</sup>。彼时我国的东北虎数量较多,圈养种群的初始建群者来源广泛,遗传多样性较高<sup>[25]</sup>。本研究所考察的横道河子猫科动物饲养繁育中心的种群来源广泛,先后从多个国家及国内动物园引进种源,因此推测这一种群携带的遗传多样性较高。Ning等<sup>[5]</sup>的研究表明,当前的东北虎野生种群已经处于中等近交水平,局部近交和遗传漂变使其原有的遗传多样性在一定程度上呈现下降趋势。

除此之外,还有研究表明,野生东北虎种群的遗传多样性较低。2003年,Russello等<sup>[26]</sup>在俄罗斯远东地区对来自至少27个个体的82个野生东北虎粪便样本进行分析,结果表明,野生东北虎线粒体控制区的单倍型多样性水平极低,82个粪便样本仅共享3种单倍型,其中最广泛的一个单倍型占有所有样本的96.4%,其余两种单倍型仅占有所有样本的3.6%。与之前Cracraft等<sup>[27]</sup>报道的14只圈养东北虎共享的4种mtDNA细胞色素*b*基因单倍型相比,在一个突变率相对较低的基因区域中有着更高水平的单倍型多样性,表明圈养个体可能比野生个体存在更大数量的遗传变异。除东北虎之外,在其他物种的研究中也存在类似结果,如Zhu等<sup>[23]</sup>在对圈养与野生大熊猫(*Ailuropoda melanoleuca*)线粒体基因组编码区的比较中发现,圈养大熊猫的遗传多样性高于野生大熊猫的遗传多样性。

本研究针对圈养与野生东北虎线粒体基因组的比较得到了类似结果,并验证了本研究的推测,圈养东北虎的遗传多样性高于野生东北虎的遗传多样性,具有更高的遗传变异水平。将线粒体基因组分区段考察,每个区段上野生种群的多样性水平也都显著低于圈养种群。这一结果虽然不能完全排除样本量的影响(野生种群只有13个个体,而圈养种群有51个个体),但是与Ning等<sup>[5]</sup>的评估结果部分相符。也就是说,从线粒体全基因组看,圈养种群的遗传多样性要高于完达山与老爷岭等地的野生东北虎的遗传多样性。相较于传统的对线粒体基因组上某一基因或片段的研究,本研究放眼于整个东北虎线粒体基因组,并针对不同区域进行分段比较,从全局水平上对东北虎线粒体遗传多样性进行评估,使遗传多样性的评价更为全面、精准。

值得关注的是,在其他保护动物的研究中<sup>[28]</sup>也发现了相似结果。这可能是圈养种群的初始群体来自不同地理区域或不同亲本个体。并且,圈养种群的繁殖受人工管理控制,以最大程度维持种群的遗传多样性水平。此外,圈养种群相对于野生种群来说,通常处于更加安全、稳定的环境中,圈养动物基本不会面临野外的自然选择压力、环境威胁或食物竞争等不利生存的困境,从而使圈养种群有更多的个体生存下来并繁殖后代。这样一来,圈养种群基因池中的各种变异就会有更大的机会传递给下一代。但需要注意的是,这些传递到下一代的遗传变异可能不都是有利的,因此在提高种群遗传多样性的同时应该注意有害基因的引入。

线粒体基因组除了D-loop区以外,所有的编码区都有其重要功能,有害突变往往影响其多方面的功能<sup>[29]</sup>。线粒体不仅被认为是能量的供应者,而且在与衰老相关的疾病发展中发挥着重要作用<sup>[30-31]</sup>,当线粒体出现严重衰退时,会导致个体适合度降低而使个体甚至种群被自然界淘汰。研究显示,虎在野生和圈养种群中都会受到有害突变的清除作用(purging)的影响,如虎指名亚种野生种群<sup>[32]</sup>和人工饲养的华南虎种群<sup>[33]</sup>。为了检验线粒体基因组的质量,本研究扫描了全基因组,在圈养和野生东北虎种群中均未发现明显的有害突变,表明虽然线粒体基因组的遗传多样性丰富度不同,但都是安全的。

### 3.3 圈养和野生东北虎的关系

本研究从圈养和野生东北虎种群的样本中得到9种单倍型,其中圈养种群7种,野生种群2种,二者之间没有共享单倍型。这说明圈养东北虎种群遗传多样性要高于野生东北虎种群,而从进化树与单倍型网络中可以看出,圈养种群的部分个体与野生东北虎属于同一进化分支,具有较近的遗传关系。因此,在利用该圈养种群部分个体实施遗传拯救时,可以在增加遗传多样性的同时避免产生远交衰退。

本研究的野生个体为随机采集,而圈养个体主要是育龄虎,是该种源基地的核心群体。统计结果显示,Hap\_2和Hap\_3分支对应的个体占全部圈养样本的64.7%,是圈养种群线粒体遗传多样性的主要组成部分。但是,它们与当前的野生种群距离甚远,说明其可能来自当前分布区以外的某个地区的灭绝种群。但该分支具体代表哪个地理种群尚不明确,日后可将该样本与中国、俄罗斯野外所有种群进

行遗传多样性综合分析,追溯其根源<sup>[34]</sup>。

#### 4 结论与建议

在本研究现有样本条件下,中国横道河子猫科动物饲养繁育中心圈养种群线粒体基因组的遗传多样性较高,且所有的遗传变异均无害。该圈养种群的部分个体与野生种群遗传关系较近,遗传多样性高度互补,可用来实施野生种群的遗传拯救,消除近交影响。应对圈养种群中的一些远缘分支及时开展野外来源追溯,确定其谱系地理学地位和保护价值,使其成为恢复野外历史遗传多样性的后备资源。

#### 参考文献:

- [1] 马建章, 张明海, 姜广顺, 等. 我国老虎及其栖息地保护面临的挑战与对策[J]. 野生动物学报, 2015, 36(2): 129-133.  
MA J Z, ZHANG M H, JIANG G S, *et al.* Challenges and strategies for conservation of tigers and their habitats in China[J]. Chinese Journal of Wildlife, 2015, 36(2): 129-133.
- [2] 龙泽旭. 东北虎栖息地变化、核心栖息地与廊道识别研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2021.  
LONG Z X. Identification of habitat change, core habitats and corridors for the Amur tiger[D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2021.
- [3] 顾佳音. 中国东北虎种群现状、冬季猎物选择及运动特征研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2017.  
GU J Y. The status of current population and distribution, winter prey selection and movement characteristics of Amur tigers (*Panthera tigris altaica*) in China[D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2017.
- [4] QI J Z, GU J Y, NING Y, *et al.* Integrated assessments call for establishing a sustainable meta-population of Amur tigers in north-east Asia[J]. Biological Conservation, 2021, 261: 109250.
- [5] NING Y, ROBERTS N J, QI J, *et al.* Inbreeding status and implications for Amur tigers[J]. Animal Conservation, 2022, 25(4): 521-531.
- [6] BIJLSMA R, BUNDGAARD J, BOEREMA A C. Does inbreeding affect the extinction risk of small populations?: predictions from *Drosophila* [J]. Journal of Evolutionary Biology, 2000, 13(3): 502-514.
- [7] XUE Y L, PRADO-MARTINEZ J, SUDMANT P H, *et al.* Mountain gorilla genomes reveal the impact of long-term population decline and inbreeding[J]. Science, 2015, 348(6231): 242-245.
- [8] HEDRICK P W, ADAMS J R, VUCETICH J A. Reevaluating and broadening the definition of genetic rescue[J]. Conservation Biology, 2011, 25(6): 1069-1070.
- [9] 张明海, 靳勇超, 姜广顺. 中国东北虎自然保护地生态廊道空间规划[J]. 自然保护地, 2021, 1(3): 1-8.  
ZHANG M H, JIN Y C, JIANG G S. Spatial planning of ecological corridors among the protected areas of Amur tiger in China [J]. Natural Protected Areas, 2021, 1(3): 1-8.
- [10] BUCKLAND S, COLE N C, GROOMBRIDGE J J, *et al.* High risks of losing genetic diversity in an endemic Mauritian gecko: implications for conservation [J]. PLoS One, 2014, 9(6): e93387.
- [11] LAN T M, LI H M, ZHANG L, *et al.* Population genomics reveals extensive inbreeding and purging of mutational load in wild Amur tigers[J]. bioRxiv, 2023. DOI: 10.1101/2023.05.09.539923.
- [12] PERRY G H, MARIANI J C, MELSTED P, *et al.* Genomic-scale capture and sequencing of endogenous DNA from feces[J]. Molecular Ecology, 2010, 19(24): 5332-5344.
- [13] BROWN W M, GEORGE M, Jr, WILSON A C. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1979, 76(4): 1967-1971.
- [14] MUELLER R L, MACEY J R, JAEKEL M, *et al.* Morphological homoplasy, life history evolution, and historical biogeography of plethodontid salamanders inferred from complete mitochondrial genomes[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004, 101(38): 13820-13825.
- [15] LIN L H, JI X, DIONG C H, *et al.* Phylogeography and population structure of the Reeves's butterfly lizard (*Leiolepis reevesii*) inferred from mitochondrial DNA sequences[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2010, 56(2): 601-607.
- [16] INAK G, LORENZ C, LISOWSKI P, *et al.* Concise review: induced pluripotent stem cell-based drug discovery for mitochondrial disease[J]. Stem Cells, 2017, 35(7): 1655-1662.
- [17] DEDA O, CHATZHOANNOU A C, FASOULA S, *et al.* Sample preparation optimization in fecal metabolic profiling[J]. Journal of Chromatography B, 2017, 1047: 115-123.
- [18] WANG B S, WANG Z L, TIAN J D, *et al.* Establishment of a microsatellite set for noninvasive paternity testing in free-ranging *Macaca mulatta tcheliensis* in Mount Taihangshan area, Jiyuan, China[J]. Zoological Studies, 2015, 54: e8.
- [19] VINCENT C, MEHROTRA S, LOO V G, *et al.* Excretion of host DNA in feces is associated with risk of *Clostridium difficile* infection [J]. Journal of Immunology Research, 2015, 2015: 246203.
- [20] AGETSUMA-YANAGIHARA Y, INOUE E, AGETSUMA N. Effects of time and environmental conditions on the quality of DNA extracted from fecal samples for genotyping of wild deer in a warm temperate broad-leaved forest [J]. Mammal Research, 2017, 62(2): 201-207.
- [21] KALIPPKE K, WERWITZKE S, VON HORNUNG M, *et al.* DNA analysis from stool samples: a fast and reliable method avoiding invasive sampling methods in mouse models of bleeding disorders[J]. Laboratory Animals, 2009, 43(4): 390-393.
- [22] WANNER N, LARSEN P A, MCLAIN A, *et al.* The mitochondrial genome and epigenome of the golden lion tamarin from fecal DNA using nanopore adaptive sequencing[J]. BMC Genomics,

- 2021, 22(1): 726.
- [23] ZHU Y X, DENG T, QIAO M J, *et al.* Comparison of genetic characteristics between captive and wild giant pandas based on 13 mitochondrial coding genes[J]. *Molecular Biology Reports*, 2022, 49(6): 4901–4908.
- [24] SYNDERCOMBE C D. Mitochondrial DNA in forensic use[J]. *Emerging Topics in Life Sciences*, 2021, 5(3): 415–426.
- [25] 马逸清, 解焱. 中国虎的起源和濒危过程的研究[J]. *野生动物*, 2010, 31(5): 262–269.
- MA Y Q, XIE Y. On the origin of tigers in China and process of endanger [J]. *Chinese Journal of Wildlife*, 2010, 31(5): 262–269.
- [26] RUSSELLO M A, GLADYSHEV E, MIQUELLE D, *et al.* Potential genetic consequences of a recent bottleneck in the Amur tiger of the Russian Far East[J]. *Conservation Genetics*, 2004, 5(5): 707–713.
- [27] CRACRAFT J, FEINSTEIN J, VAUGHN J, *et al.* Sorting out tigers (*Panthera tigris*): mitochondrial sequences, nuclear inserts, systematics, and conservation genetics[J]. *Animal Conservation*, 1998, 1(2): 139–150.
- [28] 刘思霞, 张馨元, 晏鸣霄, 等. 云南玉溪绿孔雀遗传多样性分析: 与圈养种群的比较[J]. *野生动物学报*, 2022, 43(4): 943–954.
- LIU S X, ZHANG X Y, YAN M X, *et al.* Genetic diversity analysis of green peafowl in Yuxi, Yunnan, China; a comparison with captive population[J]. *Chinese Journal of Wildlife*, 2022, 43(4): 943–954.
- [29] SHPILKA T, HAYNES C M. The mitochondrial UPR: mechanisms, physiological functions and implications in ageing[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2018, 19: 109–120.
- [30] LAGOUGE M, LARSSON N G. The role of mitochondrial DNA mutations and free radicals in disease and ageing[J]. *Journal of Internal Medicine*, 2013, 273(6): 529–543.
- [31] AMORIM J A, COPPOTELLI G, ROLO A P, *et al.* Mitochondrial and metabolic dysfunction in ageing and age-related diseases[J]. *Nature Reviews Endocrinology*, 2022, 18: 243–258.
- [32] KHAN A, PATEL K, SHUKLA H, *et al.* Genomic evidence for inbreeding depression and purging of deleterious genetic variation in Indian tigers[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2021, 118(49): e2023018118.
- [33] ZHANG L, LAN T M, LIN C Y, *et al.* Chromosome-scale genomes reveal genomic consequences of inbreeding in the south China tiger: a comparative study with the Amur tiger[J]. *Molecular Ecology Resources*, 2023, 23(2): 330–347.
- [34] STANGE M, BARRETT R D H, HENDRY A P. The importance of genomic variation for biodiversity, ecosystems and people[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2021, 22: 89–105.