

东北梅花鹿野生种群分布与遗传变异的分子鉴定

田新民^{①②} 刘鑫鑫^① 周绍春^③ 张明海^{①*} 王晓龙^{①*}

① 东北林业大学野生动物与自然保护地学院 哈尔滨 150040;

② 牡丹江师范学院生命科学与技术学院 牡丹江 157011;

③ 黑龙江省野生动物研究所 哈尔滨 150081

摘要: 梅花鹿东北亚种 (*Cervus nippon hortulorum*) 曾被认为已野外灭绝, 近年来在黑龙江东南部和吉林东部临近边境地区发现少量分布, 其生境隔离、面积狭小, 破碎化严重。亟需对其种群的遗传变化, 特别是遗传多样性和近交衰退等种群遗传信息开展进一步评价, 增强保护与管理的针对性。本研究在大、小兴安岭和长白山设计 9 个重点研究区域, 共收集 673 份疑似梅花鹿粪样样本。首先基于线粒体 DNA *Cyt b* 基因测序技术开展物种鉴定, 并对鉴定为梅花鹿的阳性样本利用微卫星技术进行个体识别。结果证实, 东北梅花鹿仅在老爷岭东部山脉有分布, 106 份梅花鹿粪便 DNA 中识别出 33 只个体 (穆稜保护区 20 只, 老爷岭保护区 13 只)。33 个 *Cyt b* 基因序列共检测出 6 个变异位点和 5 个单倍型, 单倍型多样性指数 (H_d) 为 0.621, 核苷酸多样性指数 (P_i) 为 0.006 7; 微卫星检出种群平均等位基因数 (N_a) 7.1 个, 观测杂合度 (H_o) 0.604, 期望杂合度 (H_e) 0.712, 固定系数 (F_{is}) 0.152。结果表明, 东北梅花鹿种群遗传多样性丰富, 但也存在一定程度的杂合度不足和近亲繁殖; 种群近期经历了瓶颈效应, 未发生种群扩张; 群体间无遗传分化, 可作为一个管理单元加以保护。建议, 对东北梅花鹿稀有单倍型个体重点监测和保护, 恰当时期考虑圈养种群野外放归, 以提高野外个体间基因交流和快速种群恢复。

关键词: 东北梅花鹿; 粪便 DNA; *Cyt b*; 遗传多样性; 基因流

中图分类号: Q953 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2020) 03-329-10

Molecular Identification of the Population Distribution and Genetic Variation of *Cervus nippon hortulorum*

TIAN Xin-Min^{①②} LIU Xin-Xin^① ZHOU Shao-Chun^③
ZHANG Ming-Hai^{①*} WANG Xiao-Long^{①*}

① *College of Wildlife and Protected Area, Northeast Forestry University, Harbin 150040;* ② *College of Life Science and Technology, Mudanjiang Normal University, Mudanjiang 157011;* ③ *Wildlife Institute of Heilongjiang Province, Harbin 150081, China*

基金项目 黑龙江省基本科研业务费项目 (No. 1353ZD006), 国家自然科学基金项目 (No. 30870309), 牡丹江师范学院校级项目 (No. GP2019005, MQP201405, QN2019009);

* 通讯作者, E-mail: zhangminghai2004@126.com, yttuhh@yeah.net;

第一作者简介 田新民, 男, 副教授; 研究方向: 动物分子生态学; E-mail: swxtxm@126.com。

收稿日期: 2019-11-27, 修回日期: 2020-03-14 DOI: 10.13859/j.cjz.202003007

Abstract: *Cervus nippon hortulorum* was once considered to be extinct in the wild. In recent years, some small size populations were found in the southeastern part of Heilongjiang province and the eastern part of Jilin province, nearing the border. Since the habitats of *C. n. hortulorum* are narrow, isolated and fragmented, it is an urgent need to further evaluate the genetic changes of the population, especially the genetic diversity and inbreeding decline, so as to enhance the pertinence of conservation and management. In this study, 673 suspected fecal samples of sika deer were collected from 9 key research areas in Daxing'an, Xiaoxing'an and Changbai Mountains (Fig. 1). Firstly, species identification was carried out based on DNA Cyt *b* gene sequencing technology, and the positive samples were supplied for further individual identification by microsatellite technology. At last, Microchecker 2.2.3 software was used to detect the invalid allele or allele deletion of each locus; and Genalex 6.0 software was used to calculate the population average allele number (N_a), observed heterozygosity (H_o), expected heterozygosity (H_e) and fixed coefficient (F_{is}). A total of 33 individuals (20 in Muling nature reserve and 13 in Laoyeling nature reserve) were identified from 106 fecal DNA samples of sika deer (Fig. 2 and Table 1). Six variation sites and five haplotypes were detected in the Cyt *b* sequence of these 33 individuals. The values of H_d , P_i , N_a , H_o , H_e and F_{is} were 0.621, 0.006 7, 7.1, 0.604, 0.712, and 0.152, respectively (Table 1). The results showed that the population genetic diversity of Northeastern sika deer was rich, but there was also a certain degree of heterozygosity deficiency and inbreeding (Table 1); the population experienced bottleneck effect in recent years, without population expansion (Table 1 and Fig. 5); there was no genetic differentiation between populations, which could be protected as a management unit (Table 2 and Fig. 3, 4). It is suggested that the individuals with rare haplotypes should be taken as the key point in monitoring and protection, and the artificial bred populations should be released in the field at the right time, so as to improve the gene exchange between individuals in the field and accelerate the population restoration.

Key words: *Cervus nippon hortulorum*; Fecal DNA; Cyt *b*; Genetic diversity; Gene flow

梅花鹿 (*Cervus nippon*) 隶属于偶蹄目 (Artiodactyla) 鹿科 (Cervidae) 鹿属, 为国家 I 级重点保护野生动物, 中国脊椎动物红色名录“极危”物种(汪松 1998, 蒋志刚等 2016)。前期据形态学研究表明, 世界上梅花鹿共有 13 个亚种 (Whitehead 1993), 但在中国仅残存野生梅花鹿 3 个亚种, 分别为东北亚种 (*C. n. hortulorum*)、四川亚种 (*C. n. sichuanicus*) 和华南亚种 (*C. n. kopschi*)。目前, 仅分布于相互隔离面积狭小的破碎化生境中 (黄沛琳等 2015)。梅花鹿东北亚种, 俗称东北梅花鹿, 曾认为此亚种在野外已灭绝 (盛和林 1992)。现已证实在黑龙江东南部、吉林东部临近边境地区 (蒋志刚等 2015), 黑龙江的穆棱东北红豆杉保护区 (刘鑫鑫 2017)、老爷岭东北虎保护

区 (周绍春等 2018)、吉林的珲春东北虎保护区 (黄沛琳等 2015, 杨海涛等 2018)、长白山保护区 (张鹏 2015) 等地有少量分布。因此, 本研究在大、小兴安岭、长白山脉的张广才岭、老爷岭、完达山等重点区域, 采集疑似东北梅花鹿粪便样本, 进行分子物种鉴定, 以期进一步明确东北梅花鹿野生种群的分布。

濒危物种种群的遗传变化与种群命运息息相关, 特别是遗传多样性降低和近交衰退会导致物种的灭绝, 濒危物种的种群遗传信息在物种的保护与管理中具有重要意义 (Frankham et al. 2010, 张于光等 2019)。前期, 已针对东北梅花鹿圈养个体和时间久远的馆藏标本的遗传多样性和遗传结构进行了系统的研究 (刘海等 2003, Wu et al. 2004, Lü et al. 2006, 吕晓

平等 2006, 吴华等 2006, 2008, 孙海涛等 2009)。近年来, 尽管国家主管部门对东北地区的梅花鹿实施保护工程, 使种群在重点地区得到一定程度的恢复 (Qi et al. 2015, 黄沛琳等 2015, 杨海涛等 2018, 周绍春等 2018), 但野外种群的遗传学现状仍然需要进一步评价。鉴于吉林地区的梅花鹿可能部分来源圈养个体 (石全华 2016), 因此本研究在分子鉴定东北梅花鹿野生种群分布的基础上, 针对黑龙江分布种群的遗传多样性、遗传结构和历史种群动态进行了研究, 为东北梅花鹿种群遗传保护和管理提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 样品的采集和 DNA 提取

2016 至 2019 年每年的冬季, 在大兴安岭北部的双河保护区、南部的内蒙古高格斯台罕

乌拉保护区, 小兴安岭铁力林区, 张广才岭的方正林区、苇河林区、黄泥河保护区, 老爷岭的穆棱东北红豆杉保护区、老爷岭东北虎保护区, 以及完达山的迎春林区, 共采集疑似梅花鹿粪样 673 份 (图 1)。以物种分子鉴定, 分析梅花鹿的种群分布。其中穆棱东北红豆杉保护区 (130°00' ~ 130°28' E, 43°49' ~ 44°06' N) 和老爷岭东北虎保护区 (130°47' ~ 131°18' E, 43°24' ~ 43°49' N), 采集的疑似梅花鹿粪样共 165 份 (穆棱保护区 101 份, 老爷岭保护区 64 份) (图 2)。粪便 DNA 提取使用 QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Germany), 按操作手册进行。

1.2 物种鉴定

选择引物 L14724 5'-CGA GAT CTG AAA AAC CAT CGT TG-3'和 H15149 5'-AAA CTG CAG CCC CTC AGA ATG ATA TTT GTC CTC

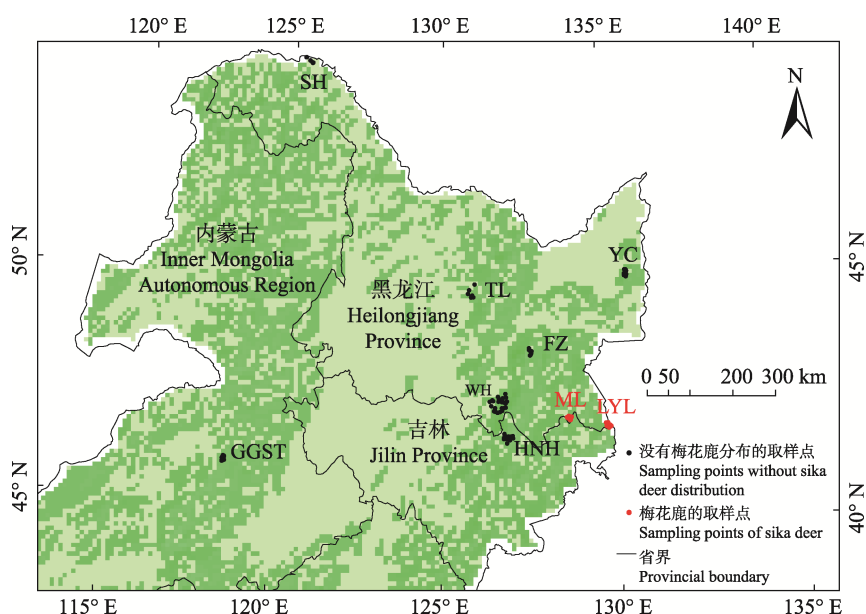


图 1 本研究的采集样点分布图

Fig. 1 Sampling sites of this study

SH. 双河国家级自然保护区; GGST. 高格斯台罕乌拉国家级自然保护区; TL. 铁力林业局; FZ. 方正林业局; WH. 苇河林业局; HNH. 黄泥河国家级自然保护区; ML. 穆棱东北红豆杉国家级自然保护区; LYL. 老爷岭东北虎国家级自然保护区; YC. 迎春林业局。

SH. Shuanghe National Nature Reserve; GGST. Gaogesitai Hanwula National Nature Reserve; TL. Tieli Forestry Bureau; FZ. Fangzheng Forestry Bureau; WH. Weihe Forestry Bureau; HNH. Huangnihe National Nature Reserve; ML. Muling Taxus National Nature Reserve; LYL. Laoyeling Amur Tiger National Nature Reserve; YC. Yingchun Forestry Bureau.

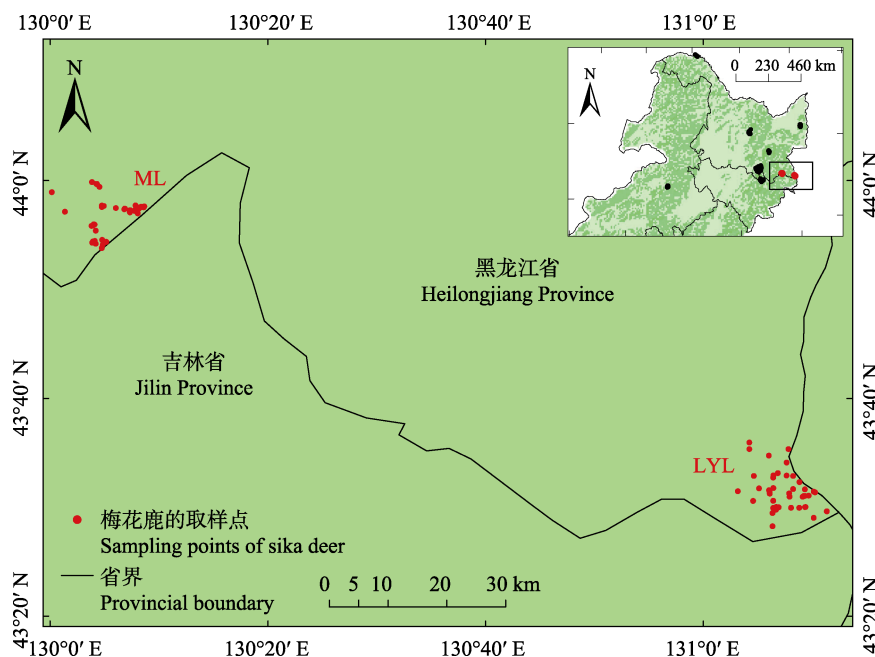


图2 梅花鹿的采集样点分布图

Fig. 2 Sampling sites of Sika Deer

ML. 穆稜东北红豆杉国家级自然保护区; LYL. 老爷岭东北虎国家级自然保护区。

ML. Muling Taxus National Nature Reserve; LYL. Laoyeling Amur Tiger National Nature Reserve.

A-3' (Kocher et al. 1989, Irwin et al. 1991) 进行样品的鉴定。PCR 反应体系 50 μ l: 1 U/ μ l KOD FX Neo DNA polymerase (Toyobo, Japan) 1 μ l, 2 \times Buffer for KOD FX Neo 25 μ l, 2 mmol/L dNTPs 10 μ l, 10 μ mol/L L14724、H15149 各 1.5 μ l, 10~30 ng/ μ l DNA 2 μ l, PCR grade water 9 μ l。反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 98 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 59 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 68 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 35 个循环; 最后 68 $^{\circ}$ C 再延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 送上海生工生物公司纯化并双向测序。使用 DNASTAR 软件包中的 SeqMan、MegAlign 和 EditSeq 进行正反序列的拼接、比对和校正。最后在 NCBI 数据库中进行 Blast 比较, 以确定粪样的来源物种。

1.3 个体识别

使用 12 对微卫星引物对确定的梅花鹿 DNA 个体识别, 引物信息和 PCR 退火温度参

见文献 (刘鑫鑫 2017), 其他反应条件同 1.2。参考多管 PCR 扩增标准, 每个位点进行 3~4 次阳性扩增, 确定最终的基因型 (Bellemain et al. 2005)。PCR 产物于 ABI 3730XL 测序仪上分型, 以 Genemapper 4.1 (美国 Applied Biosystems 公司) 确定等位基因大小。软件 Excel microsatellite tool kit, 寻找数据中相匹配的基因型, 不同样品所有位点的基因型相同或只有一个位点的一个等位基因存在差异判定为同一个体 (Bellemain et al. 2005)。使用 Microchecker 2.2.3 (van Oosterhout et al. 2004) 软件检测每个位点在每个种群中是否有无效等位基因或等位基因缺失等情况。软件 Cervus 3.0 (Kalinowski et al. 2007) 计算 12 个位点的联合 P_{ID} 值和 P_{sib} 值。软件 GenAlEx 6.0 (Peakall et al. 2006) 计算种群的平均等位基因数 (N_a)、观测杂合度 (H_o)、期望杂合度 (H_e) 和固定系数 (F_{is})。

1.4 序列分析

通过物种鉴定和个体识别所测结果, 将不同个体的序列用 Clustal X 2.1 软件(Larkin et al. 2007) 进行排列。用 DnaSP 5.10 软件(Librado et al. 2009) 分析多态位点数量(number of polymorphic sites)、单倍型数量(number of haplotypes)、单倍型多样性(haplotype diversity, H_d) 和核苷酸多样性(nucleotide diversity, P_i)。应用 Arlequin 3.11(Excoffier et al. 2005) 中的分子变异分析(analysis of molecular variance, AMOVA) 估算遗传变异在种群内和种群间的分配情况, 计算种群间遗传分化的 F -统计量(F -statistics, F_{st}), 进行显著性检测, 并计算种群间基因流程度(the number of migrants per generation, N_m)。

以测序获取的近缘种马鹿(*C. elaphus*) 序列作为外群, 利用 MEGA X(Kumar et al. 2018) 分别构建梅花鹿单倍型邻接(neighbor joining, NJ)、最大简约(maximum parsimony, MP)、最大似然(maximum likelihood, ML) 系统发育树。邻接树和最大似然树采用最佳核苷酸替代模型 T92, 最大简约树搜索方法采用 Subtree-Pruning-Regrafting, 自举检验值由 1 000 次重复检验获得。利用 DnaSP 5.10 软件计算 Tajima's D 和 Fu's F_s , 用来检测中性选择情况, 进行显著性检测; 并结合种群的增减模型(A population growth-decline model) 分析错配分布, 来检测种群的数量扩张情况(Rozas et al. 2003)。

2 结果与分析

2.1 东北梅花鹿野生种群的分布

对野外采集的 673 份粪便样品分子物种鉴定, 结果表明这些样品分别来自马鹿、梅花鹿和狍(*Capreolus pygargus*) 3 个物种。其中, 仅在老爷岭山脉的穆棱东北红豆杉保护区(简称穆棱) 和老爷岭东北虎保护区(简称老爷岭) 收集的 165 份样品中鉴定到梅花鹿个体, 证实

黑龙江境内的东北梅花鹿仅分布在老爷岭东部山脉。

165 份样品中具体得到成功扩增和测序的有 160 份, 其中, 穆棱 98 份, 老爷岭 62 份。物种鉴定结果, 在穆棱样品中有梅花鹿 51 份、马鹿 35 份和狍 12 份; 老爷岭样品中有梅花鹿 55 份和狍 7 份。基于 12 对微卫星引物个体识别, 识别出 106 份梅花鹿样品中有 33 只个体, 其中, 穆棱 20 只, 老爷岭 13 只(表 1)。软件 Microchecker 未检测到无效等位基因或等位基因缺失等情况, Cervus 软件显示 12 个微卫星位点的联合区分率很高, 并满足个体识别的要求($P_{ID} = 1.6 \times 10^{-12}$ 和 $P_{sib} = 0.08\%$)。

2.2 遗传多样性

经拼接校对后得到 Cyt *b* 序列长度为 425 bp, 其中 T、C、A 和 G 四种核苷酸的平均含量分别为 29.3%、24.6%、31.7% 和 14.4%, A + T 含量为 61%, C + G 含量为 39%, 符合动物 mtDNA AT 含量高的特点。检测到 6 个变异位点, 均为转换, 没有颠换、插入或缺失。33 只个体中, 共获得 5 个单倍型 Hap1 ~ Hap5, 其单倍型分布频率分别为 54.5%、6.1%、6.1%、30.3% 和 3.0%, Hap1 和 Hap4 为优势单倍型, 而 Hap2、Hap3 和 Hap5 为稀有单倍型(表 1 和图 3)。其中, Hap1 和 Hap4 为穆棱和老爷岭种群共享, Hap2 和 Hap3 为穆棱种群独有, Hap5 为老爷岭种群独有(表 1 和图 3)。序列分析结果表明, 梅花鹿种群遗传多样性, 穆棱种群单倍型多样性指数 $H_d = 0.674 \pm 0.007 6$, 核苷酸多样性指数 $P_i = 0.006 74 \pm 0.000 85$; 老爷岭种群 $H_d = 0.564 \pm 0.112$, $P_i = 0.007 12 \pm 0.001 18$; 整体 $H_d = 0.621 \pm 0.065$, $P_i = 0.006 70 \pm 0.000 64$ 。基于微卫星数据, 检测到整体种群平均等位基因数 $N_a = 7.1$, 观测杂合度 $H_o = 0.604$, 期望杂合度 $H_e = 0.712$ (表 1)。综上所述, 东北梅花鹿种群遗传多样性较为丰富。

2.3 遗传结构

基于构建的系统发育树, 发现邻接、最大

表 1 梅花鹿种群的遗传多样性分析

Table 1 Analysis of genetic diversity in Sika Deer populations

	样品采集地点 Population location		整体 Total
	穆棱保护区 Muling Reserve	老爷岭保护区 Laoyeling Reserve	
个体数量 Number of individuals	20	13	33
单倍型数量 Number of haplotypes	4	3	5
变异位点数 Number of variable sites	6	6	6
单倍型多样性 Haplotype diversity (H_d)	0.674 ± 0.008	0.564 ± 0.112	0.621 ± 0.065
核苷酸多样性 Nucleotide diversity (P_i)	0.006 74 ± 0.000 85	0.007 12 ± 0.001 18	0.006 70 ± 0.000 64
Tajima's D	2.208 35 ($P < 0.05$)	2.085 59 ($P < 0.05$)	2.584 29 ($P < 0.01$)
Fu's Fs	3.00 6 ($P > 0.05$)	3.795 ($P > 0.05$)	2.798 ($P > 0.05$)
单倍型分布 Location of haplotype	Hap1 ~ Hap4	Hap1、Hap4、Hap5	Hap1 ~ Hap5
等位基因数 Number of alleles (N_a)	6.8	7.4	7.1
观测杂合度 Observed heterozygosity (H_o)	0.595	0.613	0.604
期望杂合度 Expected heterozygosity (H_e)	0.689	0.735	0.712
固定系数 Fixation index (F_{is})	0.136 ($P < 0.05$)	0.166 ($P < 0.01$)	0.152 ($P < 0.05$)

简约和最大似然三种树的结构相似，并且两个种群未表现出按地理分布形成明显的簇。可以看出 Hap3 是最原始的单倍型，Hap2 和 Hap5 是较原始的单倍型，Hap1 和 Hap4 是由这 3 种单倍型进化而来的（图 3）。分子变异分析的结果表明，梅花鹿的遗传变异主要发生在种群内。种群间的遗传分化指数 (F_{st}) 为 - 0.056 9 ($P > 0.05$)，基因流 (N_m) 为无穷大（表 2）。上述

结果表明，梅花鹿的两个种群间没有显著的遗传分化，种群间基因交流频繁。

2.4 历史种群动态

采用错配分布的方法对种群历史进行检验，根据梅花鹿整体样本序列的配对距离矩阵构建的错配分布图显示，错配曲线为多峰曲线，说明东北梅花鹿进化过程中未经历典型的种群数量扩张（图 4）。Fu's Fs 中性检测显示，梅花

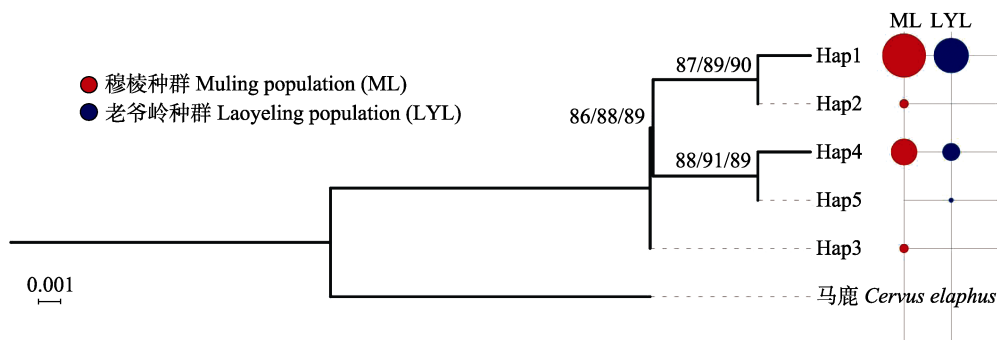


图 3 基于单倍型序列构建的梅花鹿系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of Sika Deer based on 5 haplotype sequences

分支上的数字分别表示邻接 (NJ)、最大简约 (MP) 和最大似然 (ML) 树的自举值，圆形面积代表单倍型频次。

The numbers on the branch represent the bootstrap value of the neighbor joining (NJ), maximum parsimony (MP) and maximum likelihood (ML) tree. The size of each circle represents the frequency of haplotypes.

表 2 种群的分子变异分析

Table 2 Analysis of molecular variance (AMOVA) in Sika Deer populations

变异来源 Source of variation	自由度 Degree of freedom	方差分量 Variance components	变异 Percentage of variation (%)
种群间 Among populations	1	- 0.078 76	- 5.69
种群内 Within populations	31	1.463 03	105.69
总计 Total	32	1.384 26	100
遗传分化指数 Fixation index	$F_{st} = - 0.056 9, P > 0.05$		

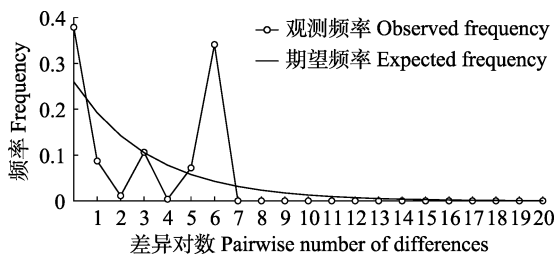


图 4 突然扩张模型下梅花鹿全部样本的错配分布图
Fig. 4 Mismatch distributions for total Sika Deer population under the sudden expansion model

鹿各种群和整体的 F_s 均为不显著的正值。但 Tajima's D 中性检测结果显示, 穆棱种群 $D = 2.208 35$ ($P < 0.05$), 老爷岭种群 $D = 2.085 59$ ($P < 0.05$), 梅花鹿整体 $D = 2.584 29$ ($P < 0.01$), 均为显著的正值(表 1)。中性检测结果表明, 梅花鹿种群可能经历过历史的瓶颈效应。微卫星分析检测到, 两个种群及整体种群的固定系数 F_{is} 均为显著的正值, 表明种群存在一定程度的杂合度不足和近亲繁殖情况(表 1)。

3 讨论

3.1 个体识别

以粪便为样本避免了对濒危物种的干扰和损伤, 在老爷岭山脉收集的 165 份粪便 DNA 中有 160 份获得扩增产物, 成功率为 97%, 高于欧亚水獭 (*Lutra lutra*, 91%) (Hung et al. 2004)、西藏马鹿 (*C. e. wallichii*, 85%) (刘艳华等 2011) 和普氏野马 (*Equus przewalskii*,

96.2%) (Liu et al. 2014)。样品采集于寒冷的冬季、野外尽可能收集新鲜样品、对扩增失败样品多次提取 DNA (2 或 3 次) 等过程保证了样品的高利用率。严格使用多管法 (multi-tube approach), 3 或 4 次 PCR 阳性扩增排除了微卫星分型时等位基因丢失和假等位基因现象, 确保个体识别的正确 (Taberlet et al. 1996, Bellemain et al. 2005, Pérez-Espona et al. 2008)。个体识别发现, 每只个体有 2 ~ 5 次的重复采样, 通过对正反测序和重复个体的序列校对进一步保证了个体序列的准确性。

3.2 遗传多样性

遗传多样性的丧失会导致动物对环境变化的适应能力下降, 甚至物种的灭绝, 而维持该物种的遗传多样性, 是濒危动物保护的一个重要目标 (Frankham et al. 2010)。本研究 33 只梅花鹿个体中, 共发现 5 个单倍型, 6 个变异位点, 占分析序列长度的 1.41% (6/425), 没有发现碱基的颠换、插入或缺失, 这与编码区序列较多发生同义突变有关 (Irwin et al. 1991)。本研究遗传多样性检测, 发现梅花鹿两个种群间的遗传多样性无显著差异。整体种群的 $H_d = 0.621$, $P_i = 0.67\%$, 与梅花鹿种群数量较高分布区的数值相近, 如俄罗斯滨海边疆区的梅花鹿 ($H_d = 0.285$, $P_i = 0.649\%$), 由俄罗斯引种到捷克的种群 ($H_d = 0.408$, $P_i = 0.791\%$) (Krojerová-Prokešová et al. 2013); 日本关东地区南部的 8 个亚种群, H_d 为 0.063 ~ 0.590, P_i 为 0.01% ~ 0.63% (Yuasa et al. 2007)。其他学者研究也认为, 我国东北梅花鹿种群遗传多样性并不贫乏 (刘海等 2003, 吕晓平等 2006, 吴华等 2006)。同时按照高遗传多样性的标准 ($H_d \geq 0.5$, $P_i \geq 0.5\%$) (Grant et al. 1998), 认为我国东北梅花鹿历史上的有效种群数量较大。当前分布区临近边境, 并可能与俄罗斯较大种群仍有频繁的基因交流。尽管现在种群数量减少, 但仍保留了相对较高的遗传多样性, 保证了对环境变化的适应能力。本研究微卫星结果也同样支持此结论。单倍型检测发现, 5

个单倍型的分布频率差异很大,只有 Hap1 和 Hap4 为穆棱和老爷岭种群共享,并为优势单倍型,分别有 18 只和 10 只个体;而 Hap2、Hap3 为穆棱种群特有,各有 2 只个体;Hap5 为老爷岭种群特有,仅有 1 只个体。Hap2、Hap3 和 Hap5 即为原始单倍型、特有单倍型,同时也是稀有单倍型。因此,在保持梅花鹿种群稳定增长的同时,保留这些稀有单倍型是未来保护工作的重点,并应尽快开展对这些个体的性别鉴定、定位和跟踪研究,实施重点监护。

3.3 遗传结构与种群动态

中性检验提示,东北梅花鹿种群可能经历过历史的瓶颈效应。东北梅花鹿的历史分布区遍布于东北地区东部,从 20 世纪初开始,最初受战争的影响,东北梅花鹿种群数量急剧下降。1953 至 1957 年中国科学院动物研究所在东北地区进行 5 年的兽类调查,没有发现野生梅花鹿,曾经一度认为我国东北梅花鹿在野外已消失(盛和林 1992)。伴随保护力度的加大,特别是红外相机监测手段的使用,证实野外仍然存在梅花鹿个体。俄罗斯远东地区在 19 世纪末和 20 世纪初,日本北海道地区也在此时期开始,受过度捕捉和大雪的影响,梅花鹿种群数量显著减少,经历了严重的瓶颈效应(Makovkin 1999, Nabata et al. 2004)。受历史瓶颈效应的影响,也同时导致全球大部分地区梅花鹿种群遗传多样性并非十分丰富(Nagata et al. 1998a, b, Goodman et al. 2001, Nabata et al. 2004, Wu et al. 2004, Lü et al. 2006, Krojerová-Prokešová et al. 2013)。检测发现,穆棱和老爷岭种群间没有出现显著的遗传分化,同时 Hap1 和 Hap4 为两种群共享,并为优势单倍型,因此从种群结构和单倍型组成来看,把两个种群作为同一个管理单元(management unit, MU)(Moritz 1994)是合理的。景观格局和物种的迁移能力是影响种群遗传结构的最重要因素(Yuasa et al. 2007, Pérez-Espona et al. 2008)。两个保护区相距约 100 km,连续的森林生境中有少数村镇,中间有开放的省道 S206 及支线

S201 和 S321 通过,在建的丹阿高速也将设计动物扩散廊道。相关研究表明,日本梅花鹿季节性迁移距离为 3.2 ~ 22.9 km,最高迁移达 101.7 km(Igota et al. 2004, Takii et al. 2012)。因此,梅花鹿较高的迁移能力和无明显的景观阻隔保证了两个种群间频繁的基因交流。考虑到种群存在特有单倍型,建议实时监测两个种群的迁移和交流情况,积极开展东北梅花鹿栖息地评价、扩散廊道和潜在分布区的建设。两个种群分布区都位于东北虎豹国家公园管理范围,随着国家公园一体化建设和保护,梅花鹿种群也定会伴随着东北虎豹国家公园管理,从而稳定生息繁衍。基于种群存在一定程度的近亲繁殖情况,建议在合适时期可以考虑圈养种群的野外放归,以满足野外个体间的基因交流和种群的快速恢复。

参 考 文 献

- Bellemain E, Swenson J E, Tallmon D, et al. 2005. Estimating population size of elusive animals with DNA from hunter-collected feces: Four methods for brown bears. *Conservation Biology*, 19(1): 150-161.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S. 2005. Arlequin version 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1(4A): 47-50.
- Frankham R, Ballou J D, Briscoe D A. 2010. *Introduction to Conservation Genetics*. 2nd ed. New York: Cambridge University Press, 235-237.
- Goodman S J, Tamate H B, Wilson R, et al. 2001. Bottlenecks, drift and differentiation: The population structure and demographic history of sika deer (*Cervus nippon*) in the Japanese archipelago. *Molecular Ecology*, 10(6): 1357-1370.
- Grant W S, Bowen B W. 1998. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: Insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *Journal of Heredity*, 89(5): 415-426.
- Hung C M, Li S H, Lee L L. 2004. Faecal DNA typing to determine the abundance and spatial organisation of otters (*Lutra lutra*) along two stream systems in Kinmen. *Animal Conservation*,

- 7(3): 301–311.
- Igota H, Sakuragi M, Uno H, et al. 2004. Seasonal migration patterns of female sika deer in eastern Hokkaido, Japan. *Ecological Research*, 19(2): 169–178.
- Irwin D M, Kocher T D, Wilson A C. 1991. Evolution of the cytochrome *b* gene of mammals. *Journal of Molecular Evolution*, 32(2): 128–144.
- Kalinowski S T, Taper M L, Marshall T C. 2007. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology*, 16(5): 1099–1106.
- Kocher T D, Thomas W K, Meyer A, et al. 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(16): 6196–6200.
- Krojerová-Prokešová J, Barančeková M, Voloshina I, et al. 2013. Dybowski's sika deer (*Cervus nippon hortulorum*): Genetic divergence between natural Primorian and introduced Czech populations. *Journal of Heredity*, 104(3): 312–326.
- Kumar S, Stecher G, Li M, et al. 2018. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6): 1547–1549.
- Larkin M A, Blackshields G, Brown N P, et al. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23(11): 2947–2948.
- Librado P, Rozas J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25(11): 1451–1452.
- Liu G, Xu C Q, Cao Q, et al. 2014. Mitochondrial and pedigree analysis in Przewalski's horse populations: Implications for genetic management and reintroductions. *Mitochondrial DNA*, 25(4): 313–318.
- Lü X P, Wei F W, Li M, et al. 2006. Genetic diversity among Chinese sika deer (*Cervus nippon*) populations and relationships between Chinese and Japanese sika deer. *Chinese Science Bulletin*, 51(4): 433–440.
- Makovkin L I. 1999. The Sika Deer of Lazovsky Reserve and Surrounding Areas of the Russian Far East. Vladivostok: Almanac Russki Ostrov Dal Press, 180–186.
- Moritz C. 1994. Defining 'evolutionarily significant units' for conservation. *Trends in Ecology & Evolution*, 9(10): 373–375.
- Nabata D, Masuda R, Takahashi O. 2004. Bottleneck effects on the sika deer *Cervus nippon* population in Hokkaido, revealed by ancient DNA analysis. *Zoological Science*, 21(4): 473–481.
- Nagata J, Masuda R, Kaji K, et al. 1998a. Genetic variation and population structure of the Japanese sika deer (*Cervus nippon*) in Hokkaido Island, based on mitochondrial D-loop sequences. *Molecular Ecology*, 7(7): 871–877.
- Nagata J, Masuda R, Kaji K, et al. 1998b. Microsatellite DNA variations of sika deer, *Cervus nippon*, in Hokkaido and Chiba. *Mammal Study*, 23(2): 95–101.
- Peakall R, Smouse P E. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6(1): 288–295.
- Pérez-Espona S, Pérez-Barbería F J, Mcleod J E, et al. 2008. Landscape features affect gene flow of Scottish Highland red deer (*Cervus elaphus*). *Molecular Ecology*, 17(4): 981–996.
- Qi J Z, Shi Q H, Wang G M, et al. 2015. Spatial distribution drivers of Amur leopard density in northeast China. *Biological Conservation*, 191(11): 258–265.
- Rozas J, Sánchez-DelBarrio J C, Messeguer X, et al. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*, 19(18): 2496–2497.
- Taberlet P, Griffin S, Goossens B, et al. 1996. Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. *Nucleic Acids Research*, 24(16): 3189–3194.
- Takii A, Izumiyama S, Taguchi M. 2012. Partial migration and effects of climate on migratory movements of sika deer in Kirigamine Highland, central Japan. *Mammal Study*, 37(4): 331–340.
- van Oosterhout C, Hutchinson W F, Wills D P M, et al. 2004. MICRO-CHECKER: Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4(3): 535–538.
- Whitehead G K. 1993. *Encyclopedia of Deer*. Shrewsbury: Swan Hill Press, 232–236.
- Wu H, Wan Q H, Fang S G. 2004. Two genetically distinct units of the Chinese sika deer (*Cervus nippon*): Analyses of mitochondrial DNA variation. *Biological Conservation*, 119(2): 183–190.

- Yuasa T, Nagata J, Hamasaki S, et al. 2007. The impact of habitat fragmentation on genetic structure of Japanese sika deer (*Cervus nippon*) in southern Kantoh, revealed by mitochondrial D-loop sequences. *Ecological Research*, 22(1): 97–106.
- 黄沛琳, 肖文宏, 杨海涛, 等. 2015. 东北梅花鹿种群活动节律和集群行为研究. *北京师范大学学报: 自然科学版*, 51(5): 498–503.
- 蒋志刚, 江建平, 王跃招, 等. 2016. 中国脊椎动物红色名录. *生物多样性*, 24(5): 500–551.
- 蒋志刚, 马勇, 吴毅, 等. 2015. 中国哺乳动物多样性及地理分布. 北京: 科学出版社, 201.
- 刘海, 杨光, 魏辅文, 等. 2003. 中国大陆梅花鹿 mtDNA 控制区序列变异及种群遗传结构分析. *动物学报*, 49(1): 53–60.
- 刘鑫鑫. 2017. 基于分子粪便学的穆稜地区同域分布梅花鹿 (*Cervus nippon*) 和马鹿 (*Cervus elaphus*) 遗传多样性比较研究. 哈尔滨: 东北林业大学硕士学位论文, 15–18.
- 刘艳华, 张明海. 2011. 基于线粒体 Cyt *b* 基因的西藏马鹿种群遗传多样性研究. *生态学报*, 31(7): 1976–1981.
- 吕晓平, 魏辅文, 李明, 等. 2006. 中国梅花鹿 (*Cervus nippon*) 遗传多样性及与日本梅花鹿间的系统关系. *科学通报*, 51(3): 292–298.
- 盛和林. 1992. 中国鹿类动物. 上海: 华东师范大学出版社, 202–212.
- 石全华. 2016. 长白山地东北虎猎物恢复—梅花鹿重引入适应性研究. 哈尔滨: 东北林业大学博士学位论文, 18–20.
- 孙海涛, 李馨, 耿忠诚, 等. 2009. 梅花鹿 3 个种群遗传多样性的微卫星标记分析. *动物学杂志*, 44(3): 30–35.
- 汪松. 1998. 中国濒危动物红皮书. 北京: 科学出版社, 266–269.
- 吴华, 胡杰, 方盛国, 等. 2006. 中国圈养梅花鹿的遗传多样性和遗传结构. *动物学杂志*, 41(4): 41–47.
- 吴华, 胡杰, 万秋红, 等. 2008. 梅花鹿的微卫星多态性及种群的遗传结构. *兽类学报*, 28(2): 109–116.
- 杨海涛, 谢冰, 韩思雨, 等. 2018. 吉林珥春自然保护区梅花鹿种群多度的季节分布及其影响因素. *北京师范大学学报: 自然科学版*, 54(4): 498–505.
- 张鹏. 2015. 基于自动相机技术的兽类监测及孢栖息地选择研究. 哈尔滨: 东北林业大学硕士学位论文, 15–16.
- 张于光, Hacker C, 张宇, 等. 2019. 三江源和祁连山国家公园雪豹种群的遗传结构分析. *兽类学报*, 39(4): 442–449.
- 周绍春, 梁卓, 金光耀, 等. 2018. 黑龙江老岭东北虎国家级自然保护区梅花鹿种群数量及分布研究. *林业科技*, 43(4): 1–3.