

唐家河自然保护区大熊猫的家庭网络:当代基因流评估

万秋红 方盛国* 李建国 张黎明 欧维富 鲜方海 陈万里

(浙江大学生命科学院, 国家濒危野生动植物种质资源保护中心, 濒危野生动物保护遗传与繁殖教育部重点实验室, 杭州 310029; 四川省林业厅, 成都 610081; 四川省野生动物资源调查保护管理站, 成都 610082; 唐家河自然保护区, 青川 628109. * 联系人, E-mail: sgfang@mail.hz.zj.cn)

摘要 利用福尔马林固定的粪便材料、寡核苷酸指纹技术以及 SRY 基因的性别判定技术, 构建了唐家河自然保护区大熊猫的家庭网络图, 同时对当代基因流(个体迁移)进行了评估. 从 124 份粪便样品中, 鉴定出 37 只大熊猫(22 只雌性和 15 只雄性). 通过分析这些个体的家庭关系, 获得如下主要结果: () 一级亲戚间的遗传相似性为 50%~90%, 无关个体间的相似性高达 77%, 说明唐家河自然保护区的大熊猫整体具有很高的遗传相似性; () 鉴定了 15 对已繁殖过的大熊猫, 发现其中 5 对是高度近亲繁殖, 提示唐家河自然保护区的大熊猫近亲繁殖现象较为严重; () 发现 4 对繁殖大熊猫和 5 个子代呈远距离迁移, 表明保护区内的栖息地是整体相连的; () 有 4 对全胞兄妹(均为雌雄对)的扩散距离很近, 且彼此交配繁殖了高度近交的子代, 反映了长距离迁移对于避免近亲繁殖是非常重要的; () 共有 17 只成年大熊猫为短或中等距离扩散, 并在景观上被分为 3 个群组, 提示有必要进一步开展栖息地的质量调查, 查明保护区内是否存在某种因素, 阻碍了大熊猫的远距离迁移扩散, 从而导致近亲繁殖, 威胁大熊猫的生存.

关键词 大熊猫 指纹技术 家庭关系 近亲繁殖 扩散模式

历史上大熊猫(*Ailuropoda melanoleuca*)曾广泛分布于我国东南部以及邻国的缅甸和越南北部^[1]. 大熊猫是隐居性动物, 每个成体均有明确的家域^[1]. 只有在交配季节(3 月中旬至 5 月中旬), 大熊猫才离开家域寻找配偶^[2]. 大熊猫以高山、亚高山和中山林地的多种竹类为主食, 其生境为海拔 1200~3500 m 的密林竹丛^[3]. 由于人类社会经济活动的影响, 大熊猫现仅分布于青藏高原东缘彼此隔离的秦岭、岷山、邛崃、凉山、大相岭和小相岭 6 大山系^[3]. 20 世纪 80 年代, 我国进行过一次大熊猫普查, 发现其野生种群的数量仅约 1000 只^[4]. 为了拯救该物种, 我国政府将其保护区的数量从 1975 年的 13 个迅速增加至现在的 35 个, 使保护区的面积从 6444 km²扩大到 15000 km², 从而保护了 70% 的大熊猫栖息地和 60% 的大熊猫个体^[3]. 然而, 保护区面积的扩大, 是否意味着大熊猫的栖息地质量、种群结构和遗传结构也达到了良好水平呢? 基于该领域的空白点, 作者以唐家河自然保护区为研究单元, 从保护遗传学角度构建大熊猫的家庭网络图, 并通过家庭网络图的有关信息, 分析保护区内大熊猫的基因流情况, 以期达到评价唐家河自然保护区大熊猫的栖息地质量, 以及种群结构和遗传结构的现状的目的.

在动物保护遗传学领域, 保护生物学家基于保护策略与保护计划制定, 以及行政管理之需要, 提出并定义了进化显著单元(ESU)和管理单元(MU)^[5-7]. 据此, 用保护遗传学的研究结果, 已将 6 个山系的大熊猫, 定义为 2 个进化显著单元和 3 个管理单元^[8]. 然而, 我国以行政区域划分的方式建立的自然保护区, 实际上代表着最为基本的管理单元. 所以, 阐明保护区内某种动物的当代基因流, 将从根本上有效地促进保护策略与相关措施的制定. 因此, 我们提出了通过构建家庭网络图, 分析小范围内的扩散模式, 来评价动物的当代基因流^[9].

基因流指一个种群的基因转移至另一个种群, 它通常是个体迁移的结果^[7]. 人类早期对栖息地的破坏, 造成许多野生动物片段化种群的产生. 而近期对栖息地的破坏, 使这些片段化种群进一步破碎化, 形成更小的破碎化亚种群. 虽然早期形成的片段化种群之间的历史基因流, 可以用间接参数 F_{st} 进行有效的评价^[10-13], 但近期才分离形成的亚种群之间的基因流, 却少有研究. 近年来, 尽管揭示破碎化亚种群的形成对自然种群之间基因流的影响是极其困难的, 但仍有学者使用了评价早期片段化种群之间历史基因流的分化指数 F_{st} 来评估破碎化亚种群间的当代基

因流^[14-17]。然而, F_{st} 仅在种群处于迁移-突变-漂流平衡的情况下才有意义, 因此, 基于保护区种群有可能不是动态平衡的, 即不是处于迁移-突变-漂流平衡状态, 以及保护区内动物的分布或多或少地相连, 且没有先前信息用于保护区内部亚种群的划分, 所以 F_{st} 是不适宜于保护区内部当代基因流分析的。于此情况下, 个体水平上的检测分析, 将是当代基因流相关数据分析的最好方法。因此, 构建保护区种群的家庭关系网络图, 并在此基础上理解当代个体的迁移现状, 对于管理者合理地制定所关注动物的科学保护方案, 是非常必要的^[9]。

虽然已有学者提出了建立野生动物家庭网络图的理论^[9], 但其实践研究却迄今未见报道。目前, 有关粪便DNA的遗传分析, 主要集中在种群的数量估计^[18]和遗传结构的评价两方面^[19,20]。粪便样品的收集, 不仅可以避免对野生动物的伤害和干扰, 还使之获得稀有和隐秘物种的DNA材料成为可能。然而, 许多研究已经表明, 由于缺乏有效的保存方法阻止DNA的快速降解, 所以从野外收集的粪便中, 仅能提取数量低, 且质量差的DNA碎片^[21,22]。利用这些质量差的DNA碎片进行野生种群数量调查, 会产生很大的偏差^[18], 从而限制了野生个体的迁移模式分析。作者的前期工作表明, 适于DNA指纹分析的高质量和高分子量DNA, 可自福尔马林固定的组织^[23]和干燥的粪便中分离获得^[24], 从而为研究者探索野生个体的迁移模式奠定了基础。

在人口稠密的中国, 大熊猫残存于严重片段化的生境中, 它们居住的大部分地区, 是岛屿状的保护区。为了促进保护区之间的基因流, 相关学者及管理者正试图寻求各种方法, 修复片段化的栖息地, 使相互隔离的保护区能够连接成连续的保护区网络^[25]。可是, 保护区内大熊猫的迁移状况, 却很少受到关注, 也许这些大熊猫正期待着人类的介入来提高它们的管理水平, 从而确保其可持续生存。有鉴于此, 本研究利用福尔马林固定的粪便样品, 寡核苷酸指纹技术和基于 SRY 基因的性别判定技术, 构建唐家河自然保护区大熊猫的家庭网络图, 以期阐明我国迄今唯一一个没有人类居住的保护区内部的大熊猫个体迁移情况。

1 材料与方法

() 取样。唐家河自然保护区位于东经 $104^{\circ}36'$

$\sim 104^{\circ}53'$, 北纬 $32^{\circ}32' \sim 32^{\circ}41'$, 海拔 $1150 \sim 3864$ m。1998年, 在大熊猫非繁殖季节的6~7月收集了1150~3500 m分布区内的大熊猫粪便样品。由于大熊猫习惯于在其家域内上下移动取食不同种类的竹子, 因此将海拔带分成5个500 m宽的栖息地样带, 利用“Z”形路线法在样带中采集粪便样品。共采集粪便样品124个(不包含1岁龄以下幼仔样品)。每个粪样取其粪团的表面约50 g后, 迅速固定于10%福尔马林溶液中保存备用。

为了测试固定粪便DNA的可靠性和检查亲权鉴定的可靠性, 从成都大熊猫繁育研究基地采集了9个圈养个体的样品, 包括福尔马林固定粪便5个、固定组织2个、血液样品2个。

() DNA提取。福尔马林固定粪便4000 r/min离心5 min, 去除粪渣, 收集上清液。上清液7000 r/min离心10 min, 丢弃上清液, 收集沉淀, 获得肠道脱落的上皮细胞。上皮细胞转移至1.5 mL的Eppendorf管内, 加入30%的酒精, 室温状态下孵育20 min。随后, 参考文献^[24], 去除细胞中的福尔马林, 并采用常规的酚/氯仿抽提法^[26], 从处理后的细胞中提取基因组DNA。

福尔马林固定组织和血液样品的DNA提取, 分别按文献^[24,26]的方法进行。

() DNA指纹技术。寡核苷酸探针gp2000 (CTCCACCT)₃是大熊猫的特异性探针^[27]。其5'末端标记方法参照文献^[28]。DNA指纹检测中的其余方法与步骤参照文献^[27]。

() 基于PCR的性别判定技术。 SRY 基因含有一个被称为高度活动团的极为保守的区域^[29]。大熊猫该基因的DNA序列已有报道(GenBank登录号: AF461117)。基于该序列, 设计了1对性别鉴定引物: S1, 5'-TGA AGC GAC CCA TGA ACG CA-3'; S2, 5'-CGG GTA TTT CTC TCT GTG CA-3'。PCR的产物长143 bp。此外, 还运用了Neurotrophin-4核基因的一对引物(N1, 5'-GCG GAT CCA TGG GGG TGA GCG AGA CAG CAC CA-3'; N2, 5'-GCG AAT TCG GCC CGA CCA GTC CG-3')^[30]作为PCR反应的阳性对照, 其PCR产物长度为412 bp。

2对引物首先正确鉴定了10只性别已知的大熊猫个体(4雌6雄), 证明引物是有效的。10只个体中名为川川的雄性大熊猫作为性别鉴定的阳性对照, 被继续用于后续的PCR反应中。PCR反应的具体条件依

据文献[30]。所有PCR反应均运用了空白对照。

每个粪便样品在伴有阴性对照的条件下,重复3次PCR反应,以确保获得准确的性别信息,避免污染DNA所造成的假阳性。本研究共有372个PCR反应。PCR的准备工作,均在迷你安全柜(Holten LaminAir, PCR MIN)中进行。

() 数据收集和分析。DNA指纹检测的操作过程中,使用了 λ 分子内标,从而保证胶内和胶间不同DNA谱带模式的比较分析。利用Quantity-One软件(Biorad, version 4.2.1)对不同胶块中的DNA指纹图进行比较,确定唐家河自然保护区中大熊猫的数量。之后,将所有鉴定出的个体的DNA样品和 λ 分子内标,点样于同一张大胶上,使之便于谱带相似系数的计算。共享带比率的计算是2倍的共享带数量除以任何2个个体的条带总数($D = 2N_{AB}/(N_A + N_B)$) [31]。谱带共享系数被用于评估个体间的遗传相似性。

在鉴定某一子代的父母时,首先根据性别信息,将所有的雌雄对,均列为可能的父母对。然后,利用个体指纹的谱带模式图,从可能的父母对中,区分出真正的父母。亲权鉴定遵循的根本规则是,子代所有的条带都应来自父母。也就是说,子代的每条条带都应该在父母的一方或双方出现。如果某一条带不能在父母中的任何一方找到匹配条带,那么,该对父母就不是此子代的生物学双亲。根据这个规则,亲权鉴定可以排除非父母或非子代个体。不过,由于小卫星DNA的突变率是很高的,子代中出现极小比率的新带有可能发生 [32]。本研究所用的小卫星探针gp2000的突变率是 4.82×10^{-4} [31],最多出现一条新带。

结合性别信息,条带排除规则为大部分个体找到了父母。在这些已鉴定的父母-子代对中,有些个体共享1或2个亲本,而另一些个体则不仅是某一对父母的子代,也是另外一个或一些个体的亲本。基于家庭之间或世代相互重叠的关系,利用SmartDraw (Version 6.2)软件对所推断的唐家河自然保护区大熊猫的家庭网络作图。

应用胡锦涛的粪便咬节法 [33],判定那些没有鉴定出子代的大熊猫个体是否属于成体。具体的判定标准为:(1)粪团直径应大于55 mm;(2)未消化叶片的长度应大于10 mm;(3)未消化竹干的长度应大于35 mm。仅被判定为成体的大熊猫,才用于后续的个体迁移模式分析。

此外,为了检验亲权鉴定的准确性,设计了一个

有效性分析方案,即作者方盛国将9个圈养个体和所采集的野生个体混合点样于同一凝胶块中,让作者万秋红在不知具体点样细节的情况下进行亲权判定。如果这些混在野生种群中的圈养个体的家谱关系能够成功地判别,那么对野生个体的家系分析也应该是可靠的。

2 结果

2.1 个体鉴定

124份粪便样品共鉴定出37只大熊猫(图1)。每只大熊猫个体被重复采样了2~7次,表明因DNA降解导致同一个体的粪便样品被错误地鉴定为2或2只以上个体的可能性是不存在的。另一方面,比较了圈养子代和它们已知父母的DNA指纹图,发现子代的所有条带均能在其父母的条带中找到(图2),表明粪便DNA没有出现条带的丢失。因此,从福尔马林固定的粪便样品中提取的DNA是可靠的,完全能够被用于进一步的遗传分析。

DNA指纹图显示了酶切片段的大小介于2.0~24.0 kb之间,条带平均数为 36.00 ± 0.78 。所有的个体均呈现了2条单态带,一条位于21.2 kb,另一条位于6.9 kb(图1)。

2.2 性别、亲缘关系和亲权分析

所有个体均产生了阳性对照的412 bp片段,而每一步PCR反应的空白对照均未产生带(图3),表明PCR分析是可靠的。除了412 bp这条带以外,143 bp的性别特异性条带也出现在雄性对照个体和一些其他个体中(图3)。同一个体不同粪便的DNA样品,产生了完全相同的PCR产物条带模式。所以,37只大熊猫的性别,被重复鉴定了6~21次,故而确保了可靠的性别信息。基于性别特异性的SRY基因片段,从37只野生大熊猫中鉴定出了15只雄性和22只雌性(图3)。

根据37个个体的特异性指纹图谱,共排列组合了666个个体对,用于共享条带数的计算。由于个体总带的平均数为 36.00 ± 0.78 ,所以相似性系数可计算为共享条带数除以基数36($D = N_{AB}/36$)。666个数据基于共享条带数或相似性系数进行作图(图4),相似性的最低值和最高值分别为15%和90%。

根据性别信息,首先为每个个体列出了所有可能的父母对。继后,运用条带排除规则对9只圈养个体和37只野生个体进行了亲权鉴定。结果表明,9只

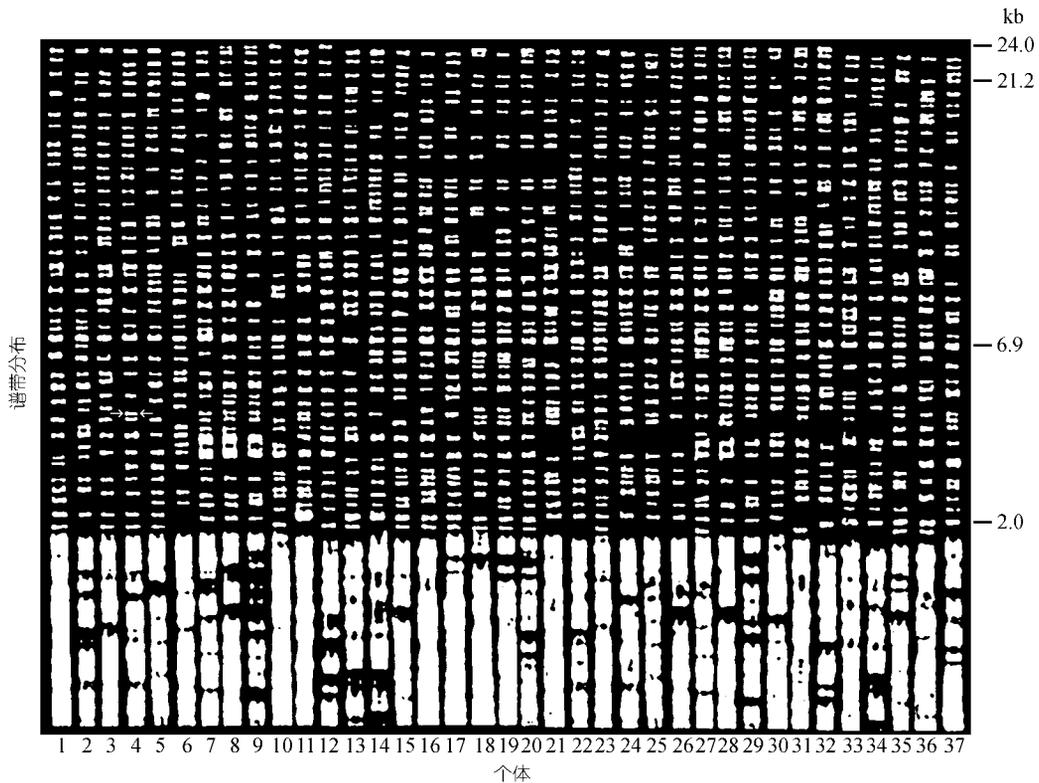


图 1 唐家河自然保护区 37 只熊猫个体的 DNA 指纹图谱
箭头所示为一条新带

圈养个体的家庭关系从混合群体中被成功地检测出来, 即 5 个父母-子代对(AB-C, DE-F, CF-G, CF-H 和 CF-I)和 3 个世代(A-B-D-E, C-F 和 G-H-I)与其实际的谱系是一致的. 因此, 表明野生个体的亲权鉴定结果是可靠的.

除 10 只个体(图 1 中的泳道 1, 6, 10, 14, 15, 21, 22, 31, 34 和 37)以外, 其他个体均鉴定出惟一的父母对, 未发现任何个体有多重父母被推定的情况, 反映了 gp2000 探针的高分辨概率. 至于 10 只个体未能鉴定出父母的原因, 可能是由于缺乏它们父母的基因材料.

4 号熊猫与 3 和 5 号熊猫都共享 80% 的条带, 且与这对熊猫相比, 仅呈现 1 条不匹配带. 因此, 3 和 5 号个体被认为是 4 号熊猫的双亲. 相应地, 在唐家河自然保护区的大熊猫种群中发现了 1 条突变带(图 1). 依据所有已鉴定出的亲本与子代的关系, 作者构建了该保护区大熊猫的家庭网络图(图 5).

为了便于进一步的分析, 在家庭网络图的基础上, 将所有大熊猫分为一级亲戚(父母/子代; 全胞兄

妹)、二级亲戚(祖父母/孙代; 姑姑-舅舅/侄子-外甥; 半胞兄妹)和远亲或无关个体. 一级和二级亲戚间的相似性范围分别为 50%~90%和 25%~84%(图 4). 远亲和无关个体间的相似性高达 77%, 大部分与二级亲戚相重叠(图 4), 表明唐家河大熊猫具有非常高的遗传相似性.

从 37 只大熊猫个体中, 总共鉴定出 15 对繁殖个体. 其中, 5 对是近亲繁殖对(1 例回交, 4 例全胞兄妹间繁殖)(图 5), 提示严重的近交使唐家河大熊猫种群潜在着遗传衰退的危险.

雌性大熊猫一般一次生育一只幼仔^[1]. 本研究发现大部分大熊猫的繁殖对, 都有 2~3 只子代个体, 表明大熊猫喜于同以前交配繁殖成功的配偶交配生育.

唐家河大熊猫一般在 6.5~7.5 岁开始交配^[3]. 因此, 基于家庭网络图的世代数目(图 5), 推算: (1) 1 和 6 号个体至少 26 岁; (2) 23 和 31 号个体至少 19.5 岁; (3) 15, 21, 22, 27 和 28 号个体至少应该有 13 岁; (4) 3, 5, 7, 9, 10, 14, 16, 20, 26, 34 和 37 号个体至少在 6.5 岁以

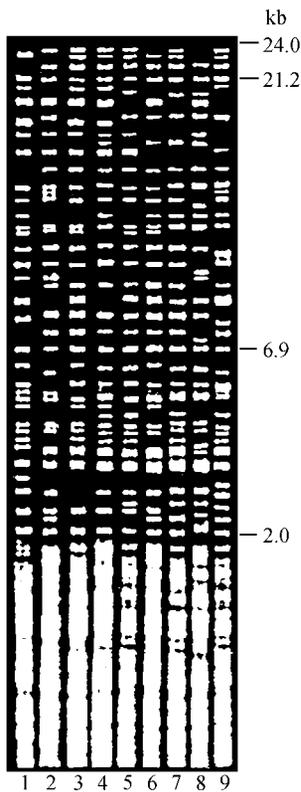


图2 9只圈养大熊猫的DNA指纹图谱

1~9泳道对应于大熊猫个体A, B, C, G, H, I, F, D和E。它们的谱系为: A♂×B♀→C♂; D♂×E♀→F♀; C♂×F♀→G♂+H♀+I♂。研究材料包括取自于个体A, B, C, D和E的福尔马林固定粪便样品以及来自个体G和H的福尔马林固定组织; 取自个体F和I的血样

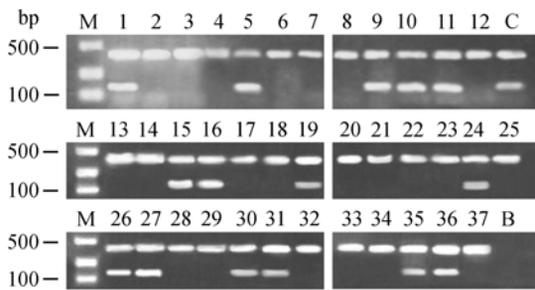


图3 性别鉴定的扩增模式图

M, 分子量标记; C, 性别已知的个体(川川, 雄性); B, 空白对照。1~37, 对应于图1中的37只大熊猫个体。143和412 bp条带分别是SRY基因和Neurotrophin-4基因的PCR产物

上; (5) 剩余个体经运用粪便咬节法判定, 发现4, 8, 13, 29和32号为青少年个体, 余下则为成年个体。

2.3 个体迁移模式

基于取样地点, 将37只大熊猫的性别信息和具体位置标于保护区的地图上(图6), 以便进行交配路

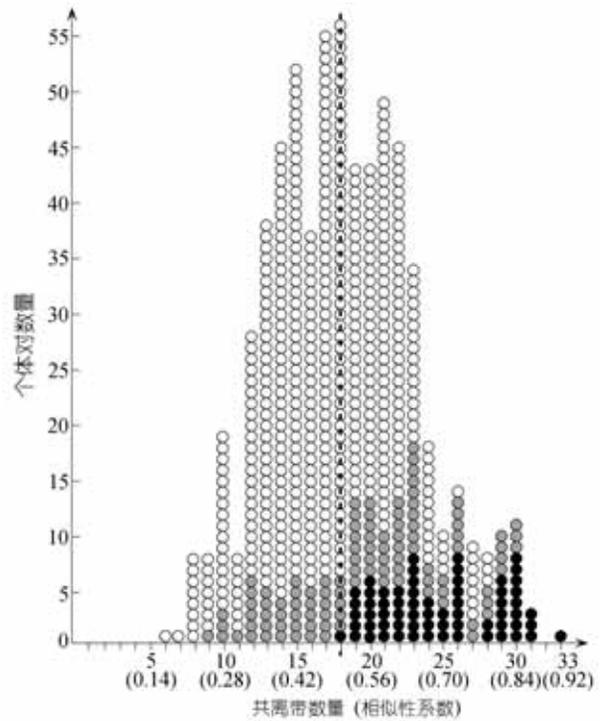


图4 37只大熊猫个体之间的共享条带数据分布图
实心黑圈和灰圈分别代表一级亲戚间和二级亲戚间的共享带数据; 空心圈是指远亲或无关个体间的共享带数据。虚线标出相似系数平均值 D = 0.05

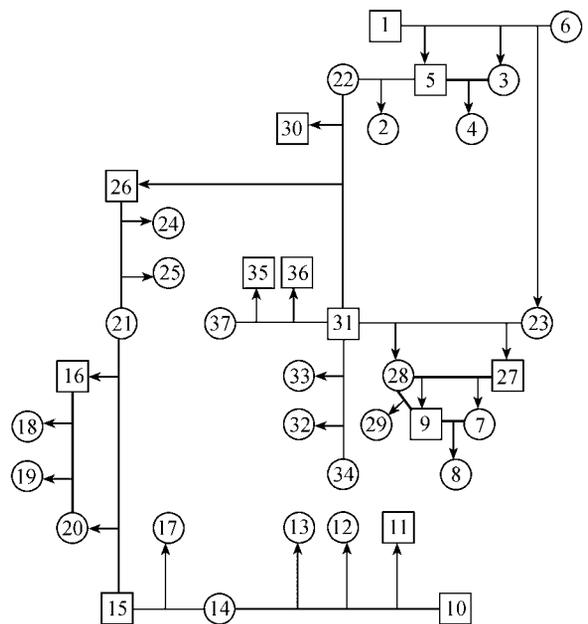


图5 唐家河自然保护区家庭网络图
数字1~37对应于图1中的1~37号个体。正方形和圆圈分别代表雄性和雌性个体。加粗线条是指近亲间的交配路线, 而箭头是指父母与子代的关系

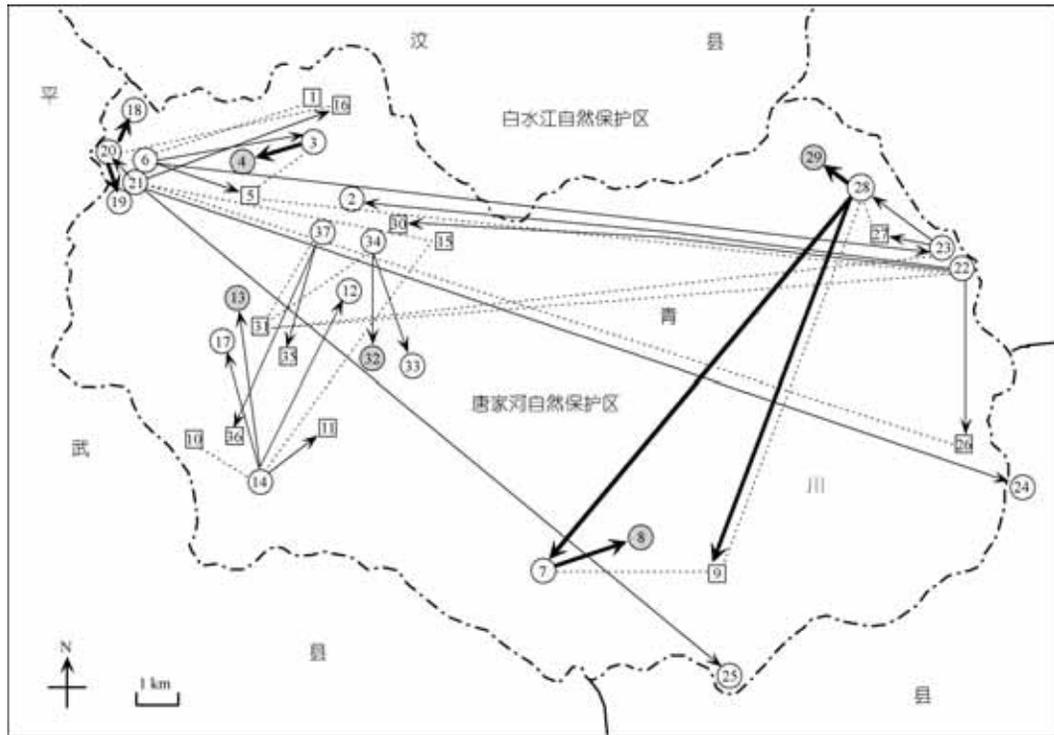


图 6 唐家河保护区大熊猫迁移模式图

点虚线是指保护区的边界。数字 1~37 对应于图 1 中的 1~37 号个体。点线是指交配路线，而箭头是指母系子代扩散路线。正方形和圆圈分别代表雄性和雌性个体。灰色符号是指基于粪便咬节法推断的青少年个体。加粗箭头代表近亲繁殖

线和扩散模式的分析。

由图 6 标出的 15 对亲本的交配路线可知，4 对大熊猫(5-22, 31-22, 31-23 和 21-26)迁移了很远的距离进行交配，其余对则是就近获得了配偶。由于大熊猫的交配体系是求偶场类型^[34]，因此不一致的交配路线说明唐家河大熊猫种群可能有几个求偶场，且其中一些求偶场促进了保护区东西部大熊猫的基因交流。

以雌性大熊猫为基点，本研究标出了母系子代的迁移路线(图 6)，并发现有 5 只个体(4 雌 1 雄)呈现长距离扩散。综合上述的交配路线，分析得知共有 9 例为远距离迁移，表明唐家河自然保护区是连成一体，没有严重的片段化产生。然而，也有相当多的个体为短或中距离扩散(图 6)。在这些个体中，3, 5, 7, 9, 16, 20, 27 和 28 号是已有子代的成年个体，而 11, 12, 17, 18, 19, 26, 33, 35 和 36 号是没有子代的成体(通过粪便测量参数判定)。7 和 9 号是全胞兄妹对，它们从其母亲(28 号)的家域进行了中度距离的扩散。其他几对熊猫如 3-5, 20-16, 27-28 均是全胞兄妹对(也是雌雄对)，每对都分别从其父母(6, 21 和 23 号)的家

域进行了短距离扩散。

在唐家河大熊猫种群中，有 7 个高度近亲繁殖的子代，分别是 4, 7, 8, 9, 18, 19 和 29 号(图 5 和 6)。其中，8 号是全胞兄妹 7 和 9 号所生，这 2 只个体均在离母亲不远的地方重新建立自己的家域。其他高度近亲繁殖的个体，均来自于短距离扩散的亲本熊猫(图 5 和 6)。该结果表明子代的长距离扩散，对于大熊猫避免近亲繁殖是极其重要的。

3 讨论

研究表明，福尔马林会诱导蛋白质与 DNA 之间发生交联，导致 DNA 断裂^[35]，从而可能使福尔马林固定样品的 DNA 条带模式变得模糊不清。然而，本文的方法与文献方法相结合，获得了 124 个清晰易辨的大熊猫 DNA 指纹图谱，表明其粪便样品中的福尔马林已被完全清除，没有影响分析结果。

我国于 1999 年 10 月~2000 年 1 月对青川县的大熊猫进行了第 3 次调查，结果发现唐家河保护区共有大熊猫 38 只(国家林业局大熊猫 2004 普查报告)。本研究从 124 份粪便样品中共鉴定出 37 只个体，其结果与大熊猫第 3 次普查所公布的数字基本一致。

有研究表明,大熊猫每天要花96%的时间吃竹子^[33],这使得大熊猫的日均移动距离大约在411±484 m^[34].在本研究中,具有相同DNA指纹图谱的不同粪便间的距离均小于900 m,说明这些粪便应该是由同一只大熊猫留下的.另一方面,由于本文所用的大熊猫专一性DNA指纹探针gp2000具有极高的鉴定概率(2.18×10^{-10})^[27],因此,这些重复的DNA指纹完全代表着同一只个体,从而保证了文中个体数量、亲权鉴定和家庭网络等分析结果的可靠性.

根据本研究建立的唐家河大熊猫的家庭网络图,得到了几个近亲繁殖案例.这些近亲繁殖个体的相似性均在80%~90%之间(图4).此外,37只大熊猫个体间的平均相似性系数为51%,说明唐家河大熊猫的平均遗传相似性已经达到了远交动物一级亲戚相似性系数(50%)^[36]的水平.

唐家河自然保护区始建于1978年,总面积约400 km²,保护的主要对象有大熊猫、金丝猴和羚牛^[3].自保护区建立以来,区内的所有居民不仅均已迁出,且严禁任何务农活动,比如采集竹笋等.这使得唐家河自然保护区成为我国迄今惟一一个没有人类居住而免受干扰的保护区.此外,保护区内曾被农业耕种破坏的部分已经被修复,确保了大熊猫在该保护区内的无阻隔迁移^[3].本研究发现,在唐家河保护区有4对大熊猫和5只子代为长距离迁移,正好印证了该保护区的大熊猫栖息地连通性好,同时也表明构建家庭网络图这一方法,可用于评价大熊猫和其他濒危动物自然栖息地的连通性问题,也即是否存在着栖息地的片段化问题.

尽管大熊猫在唐家河保护区未出现栖息地片段化,但有17只成体大熊猫表现为短或中距离的迁移模式,且在这些个体中,有8只是全胞兄妹对(雌雄对).它们之间的近亲交配,繁育了7个极度近交的子代,表明短距离扩散易于导致近亲繁殖.此结果似乎与唐家河保护区内优越的生存环境极为矛盾,因为优越的生存环境,会促使更长、更频繁和更容易的迁移.再者,图6的迁移模式图表明,37只大熊猫形成了3个群体,因此,结合栖息地的质量,作者认为大熊猫的短距离迁移不是自然发生的,而是源于某种因素被迫为之.

唐家河自然保护区的大熊猫数量在1987年约为45只^[33].然而,随着栖息地环境的显著改善,大熊猫的数量却不可思议地于1999年下降至38只(大熊猫

2004年普查数据).因此,成体的短距离扩散、高度近交子代的产生,以及种群数量在优越环境下的下降,提示着唐家河自然保护区大熊猫的生存,正受到某种因素的严重影响.

众所周知,羚牛(*Budorcas taxicolor tibetana*)也是唐家河自然保护区的主要保护对象之一.1987年当大熊猫的数量为45只^[33]时,羚牛的数量约为500头^[37].随着栖息地环境的显著改善,羚牛现已膨胀至1000头(胡锦涛,个人交流),大约是大熊猫数量(38只)的25倍.那么,阻碍大熊猫迁移的原因是否与羚牛种群的过度膨胀有关呢?基于大熊猫和羚牛之间存在着竹源利用和栖息地分布的重叠性以及二者在体型与体重等方面存在较大差异等原因,我们提出“羚牛种群的过度膨胀,可能阻碍了大熊猫的迁移”的假想,期待着通过进一步的深入研究,查明导致大熊猫短距离扩散和近亲繁殖的真正原因,使管理者能够制定出更为有效的管理方案,以改善当前此保护区大熊猫的生存环境.

致谢 本工作由国家杰出青年基金(批准号:30325009)、国家重点基础研究发展规划(批准号:G2000046906)和国家林业局大熊猫研究专项基金资助项目.

参 考 文 献

- 1 Lü Z, Kerm E. Wanted Alive! Giant Pandas in the Wild. A WWF Species Status Report. WWF International, Gland, Switzerland, 2001
- 2 Schaller G B, Hu J, Pan W, et al. The Giant Pandas of Wolong. Chicago: University of Chicago Press, 1985
- 3 胡锦涛. 大熊猫研究. 上海: 上海科学技术教育出版社, 2001
- 4 Johnson K, Schaller G, Hu J. Responses of giant panda to a bamboo die-off. Natl Geogr Res, 1988, 4: 161~177
- 5 Alves M J, Coelho H, Collares-Pereira M J, et al. Mitochondrial DNA variation in the highly endangered cyprinid fish *Anaocypris hispanica*: Importance for conservation. Heredity, 2001, 87: 463~473[DOI]
- 6 Hedrick P W, Parker K M, Lee R N. Using microsatellite and MHC variation to identify species, ESUs, and MUs in the endangered Sonoran topminnow. Mol Ecol, 2001, 10: 1399~1412[DOI]
- 7 Frankham R, Ballou J D, Briscoe D A. Introduction to Conservation Genetics. New York: Cambridge University Press, 2002
- 8 Wan Q H, Fang S G, Wu H, et al. Genetic differentiation and subspecies development of the giant panda as revealed by DNA fingerprinting. Electrophoresis, 2003, 24: 1353~1359[DOI]
- 9 Wan Q H, Wu H, Fujihara T, et al. Which genetic marker for which conservation genetic issue? Electrophoresis, 2004, 25: 2165~2176[DOI]
- 10 Barber P H. Patterns of gene flow and population genetic structure

- in the canyon treefrog, *Hyla arenicolor* (Cope). *Mol Ecol*, 1999, 8: 563~576[DOI]
- 11 Walton C, Handley J M, Tun-Lin W, et al. Population structure and population history of anopheles dirus mosquitoes in Southeast Asia. *Mol Biol Evol*, 2000, 17: 962~974
- 12 Stenson A G, Malhotra A, Thorpe R S. Population differentiation and nuclear gene flow in the Dominican anole (*Anolis oculatus*). *Mol Ecol*, 2002, 11: 1679~1688[DOI]
- 13 Chauvet S, van der Velde M, Imbert, E, et al. Past and current gene flow in the selfing, wind-dispersed species *Mycelis muralis* in western Europe. *Mol Ecol*, 2004, 13: 1391~1407[DOI]
- 14 Orell M, Lahti K, Koivula K, et al. Immigration and gene flow in a northern willow tit (*Parus montanus*) population. *J Evol Biol*, 1999, 12: 283~295[DOI]
- 15 Ramirez M G, Haakonsen K E. Gene flow among habitat patches on a fragmented landscape in the spider *Argiope trifasciata* (Araneae: Araneidae). *Heredity*, 1999, 83: 580~585[DOI]
- 16 Williams B L, Brawn J D, Paige K N. Landscape scale genetic effects of habitat fragmentation on a high gene flow species: *Speyeria idalia* (Nymphalidae). *Mol Ecol*, 2003, 12: 11~20[DOI]
- 17 David J A, Terence P H. Climate change, genotypic diversity and gene flow in reef-building corals. *Ecol Letters*, 2004, 7: 273~278[DOI]
- 18 Creel S, Spong C, Sands J L, et al. Population size estimation in Yellowstone wolves with error-prone noninvasive microsatellite genotypes. *Mol Ecol*, 2003, 12: 2003~2009[DOI]
- 19 Prugnolle F, Meesûs T, Durand P, et al. Sex-specific genetic structure in *Schistosomamansoni*: Evolutionary and epidemiological implications. *Mol Ecol*, 2002, 11: 1231~1238[DOI]
- 20 Goossens B, Chikhi L, Jalil M F, et al. Patterns of genetic diversity and migration in increasingly fragmented and declining orang-utan (*Pongo pygmaeus*). *Mol Ecol*, 2005, 14: 441~456[DOI]
- 21 Nsubuga A M, Robbins M M, Roeder A D, et al. Factors affecting the amount of genomic DNA extracted from ape faeces and the identification of an improved sample storage method. *Mol Ecol*, 2004, 13: 2089~2094[DOI]
- 22 Roeder A D, Archer F I, Poinar H N, et al. A novel method for collection and preservation of faeces for genetic studies. *Mol Ecol Notes*, 2004, 4: 761~764[DOI]
- 23 Wan Q H, Fang S G, Chen G F, et al. Use of oligonucleotide fingerprinting and faecal DNA in identifying the distribution of Chinese tiger (*Panthera tigris amoyensis* Hilzheimer). *Biodivers Conserv*, 2003, 12: 1641~1648[DOI]
- 24 Fang S G, Wan Q H, Fujihara N. Formalin removal from archival tissue by critical point drying. *Biotechniques*, 2002, 33: 604~611
- 25 Loucks C J, Lü Z, Dinerstein E, et al. The giant pandas of the Qinling Mountains, China: A case study in designing conservation landscapes for elevational migrants. *Conserv Biol*, 2003, 17: 558~565[DOI]
- 26 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- 27 Fang S G, Wan Q H, Fujihara N. A new oligonucleotide probe of the giant panda. *Mol Ecol Notes*, 2002, 2: 352~355[DOI]
- 28 Schäfer R, Zischler H, Birsner U, et al. Optimized oligonucleotide probe for DNA fingerprinting. *Electrophoresis*, 1988, 9: 369~374[DOI]
- 29 Nagai K. Molecular evolution of *Sry* and *Sox* gene. *Gene*, 2001, 270: 161~169[DOI]
- 30 Rao G, Fang S G, Fujihara T, et al. Expression of biologically active *Neurotrophin-4* of giant panda in *Escherichia coli*. *Acta Theriologica Sinica*, 2004, 24: 13~18
- 31 Lynch M. The similarity index and DNA fingerprinting. *Mol Biol Evol*, 1990, 7: 478~484
- 32 Peacock M M, Smith A T. Nonrandom mating in pikas *Ochotona princeps*: Evidence for inbreeding between individuals of intermediate relatedness. *Mol Ecol*, 1997, 6: 801~811[DOI]
- 33 胡锦涛. 大熊猫生物学研究与进展. 成都: 四川科学技术出版社, 1990.
- 34 潘文石, 吕植, 朱小键, 等. 继续生存的机会. 北京: 北京大学出版社, 2001.
- 35 Battifora H. Effect of fixatives and fixation times on the tissues. *Am J Clin Pathol*, 1991, 96: 144~145
- 36 Lynch M. Estimation of relatedness by DNA fingerprinting. *Mol Biol Evol*, 1988, 5: 584~599
- 37 葛桃安, 胡锦涛, 江道明, 等. 唐家河自然保护区扭角羚的兽群结构及数量分布. *兽类学报*, 1989, 9: 262~268

(2005-05-26 收稿, 2005-07-14 收修改稿)