

青海省东部地区喜马拉雅旱獭种群遗传结构

闫京艳^{1 2 3} 林恭华^{1 2} 陈洪舰⁴ 李千⁴ 覃雯^{1 2} 苏建平^{1 2*} 张同作^{1 2*}

(1 中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810001) (2 青海省动物生态基因组学重点实验室, 西宁 810001)

(3 中国科学院大学, 北京 100049) (4 青海省地方病预防控制所, 西宁 811602)

摘要: 本研究利用 11 个微卫星标记对采自青海省东部地区的 13 个喜马拉雅旱獭 (*Marmota himalayana*) 种群 149 个个体进行基因分型, 并运用种群遗传学方法对其遗传多样性和遗传结构进行分析。结果显示, 11 个微卫星标记位点共计检测到 97 个等位基因, 各种群的平均观测杂合度和期望杂合度范围分别为 0.58~0.82 和 0.60~0.79, 种群遗传多样性水平相对较高; 遗传结构分析表明, 青海省东部地区的喜马拉雅旱獭种群具有显著的遗传结构, 13 个地理种群形成了 3 个遗传聚类群, 且 3 个遗传聚类群与湟水河和黄河上游干流所划分的地理单元完全一致, 因此我们认为湟水河和黄河上游干流是阻碍该地区喜马拉雅旱獭种群进行迁移扩散和基因交流的天然屏障。同时, STRUCTURE 分析结果还显示 3 个遗传聚类群间仍有明显的基因流, AMOVA 分析也显示 3 个聚类群间变异百分比为 6.60%, 仅略高于聚类群内种群间的变异 (4.51%), 而远低于种群内变异水平 (88.90%), 表明 3 个聚类群间的分化程度并不是很深。这说明喜马拉雅旱獭可能通过桥梁或在枯水期等穿越河流进行基因交流。以上结果为该地区的旱獭种群监控和鼠疫防控提供科学的理论基础。

关键词: 旱獭; 遗传多样性; 遗传结构; 微卫星

中图分类号: Q346

文献标识码: A

文章编号: 1000-1050 (2018) 05-0458-09

Genetic structure of the Himalayan marmot (*Marmota himalayana*) population in eastern Qinghai Province

YAN Jingyan^{1 2 3}, LIN Gonghua^{1 2}, CHEN Hongjian⁴, LI Qian⁴, QIN Wen^{1 2}, SU Jianping^{1 2*}, ZHANG Tongzuo^{1 2*}

(1 Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, China)

(2 Qinghai Provincial Key Laboratory of Animal Ecological Genomics, Xining 810001, China)

(3 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

(4 Qinghai Institute for Endemic Disease Prevention and Control, Xining 811602, China)

Abstract: In this study, 149 Himalayan marmot individuals from 13 populations were sampled from eastern Qinghai and genotyped at 11 microsatellite loci. Then the genetic diversity and genetic structure of these populations were analyzed using different population genetics methods. As the results showed, a total of 97 alleles were detected at all 11 SSR loci. The average observed heterozygosity and expected heterozygosity for each population ranged from 0.58 and 0.60 to 0.82 and 0.79, representing a relatively high level of genetic diversity. The genetic structure analyses demonstrated that the marmot populations in eastern Qinghai exhibited a strong genetic structure, where 13 geographical populations were allocated into 3 genetic clusters. Surprisingly, such three gene-tic clusters are in perfect accordance with the geographical units divided by the trunk stream of the Huangshui River and the head trunk stream of the Yellow River. Therefore, we conclude that these two rivers act as natural barriers to the dispersal and gene-flow between the marmot populations in different units. Meanwhile, as suggested by the STRUCTURE analysis, there was still obvious gene-flow between the three genetic clusters, and the AMOVA analysis also showed that the percentage of the variance between genetic clusters was 6.60%, slightly higher

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2017YFC0506405); 国家自然科学基金项目 (31370405, 81460508); 青海省重点实验室发展专项 (2017-ZJ-Y23)

作者简介: 闫京艳 (1988-), 女, 博士研究生, 主要从事动物适应与进化研究。

收稿日期: 2018-01-04; 修回日期: 2018-05-08

* 通讯作者, Corresponding authors, E-mail: jpsu@nwipb.cas.cn; zhangtz@nwipb.cas.cn

than that between different populations within clusters (4.51%) and far lower than that within populations (88.90%), indicating a low degree of differentiation between the genetic clusters. All such results implied that the Himalayan marmots may cross over the rivers by some bridges or in low water periods to disperse and exchange. These results can provide scientific information for the monitoring and management of marmot populations and even plague control in this region.

Key words: Genetic diversity; Genetic structure; Marmot; SSR

喜马拉雅旱獭 (*Marmota himalayana* Hodgson, 1841), 隶属于松鼠科 (Sciuridae), 非洲地松鼠亚科 (Xerinae), 旱獭族 (Marmotini), 旱獭属 (*Marmota*) (Steppan *et al.*, 2004), 是一种大型地栖啮齿动物。目前全世界公认的旱獭共有 15 种, 包括北美的 6 种和欧亚的 9 种 (Nikol'skii and Rumiantsev, 2012)。而我国已报道的旱獭有 4 种: 喜马拉雅旱獭、蒙古旱獭 (*M. sibirica*)、灰旱獭 (*M. baibacina*) 和长尾旱獭 (*M. caudata*) (Chen *et al.*, 2012)。其中, 喜马拉雅旱獭是数量最多、分布最为广泛的一种, 主要见于青海、西藏、云南、四川、甘肃、宁夏、内蒙古和新疆的草原地区。旱獭由于其特殊的生物学特性, 在休眠生理、低氧适应 (McKean and Mendenhall, 1996)、社会制度 (Kruckenhauser *et al.*, 1999)、心脑血管疾病 (Li *et al.*, 2012) 以及乙肝防治 (Menne and Cote, 2007) 等方面一直是研究的焦点, 而喜马拉雅旱獭作为青藏高原鼠疫自然疫源地中最主要的疫源动物, 在鼠疫流行、防控以及其它生物学相关研究中更是备受关注 (张安宁等, 2002; 骆孝志和海荣, 2010)。

鼠疫, 曾称“黑死病”, 是由耶尔森菌引起的一种烈性传染病, 因传染性强、传播速度快和病死率高等特点成为人类社会的巨大威胁, 历史上 3 次世界范围的鼠疫大流行对社会、经济和文化等都产生了毁灭性打击 (Perry and Fetherston, 1997; Gage and Kosoy, 2005)。现今, 鼠疫在非洲及亚洲地区的流行呈现增长的态势, 根据世界卫生组织的统计, 2010 年至 2015 年全球共有 3 248 起鼠疫流行, 其中共造成死亡 584 例 (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs267/en/>), 这些数据让我们再次意识到当前鼠疫防控形势严峻。青藏高原鼠疫自然疫源地是我国最大和最为活跃的鼠疫自然疫源地之一, 喜马拉雅旱獭作为该地区最主要的疫源动物, 在鼠疫菌的留存、传播和流行中起关键作用 (骆孝志和海荣, 2010), 种群的迁移扩散和交流等与其介导的鼠疫菌甚至鼠疫疫情的传播和扩散有密切联系, 因此, 这些生物学特征也是鼠疫防控工作, 特别是

疫源动物种群监控等需要考虑的重要问题。青海省东部地区是整个青藏高原鼠疫自然疫源地中人口最为稠密的地区, 也是青藏高原连结内地的重要通道, 有造成鼠疫远距离传播流向内地的巨大潜在威胁。根据调查, 该地区及其周边在近几年不断有动物鼠疫流行并波及人类的记录, 一些地区甚至被评为鼠疫高风险区 (尚国宝等, 2015; 郑谊等, 2017)。为此, 我们利用分子生物学和种群遗传学方法对青海省东部地区喜马拉雅旱獭种群的遗传多样性和遗传结构进行研究, 对可能影响喜马拉雅旱獭迁移扩散、基因交流和遗传分化的地理隔离因素进行分析, 以期为该地区的旱獭种群监测和鼠疫防控等提供科学参考。

1 研究方法

1.1 样品采集

2014 年至 2016 年在青海省东部 6 个县进行样品采集, 采样点共 13 个, 采集样本共 149 份。为探究湟水河和黄河上游干流对喜马拉雅旱獭种群基因交流可能存在的影响, 13 个采样点分别布设在两条河流所划分出的 3 个地理区块上, 即湟水河以北、湟水河与黄河上游干流之间以及黄河上游干流以南。具体的采样点分布情况见图 1 和表 1。采样方法主要是熏蒸法、踩夹或钢丝活套法, 捕获旱獭后采集大腿部肌肉保存至 95% 乙醇中。

1.2 总 DNA 提取

采用 Ezup 柱式动物基因组 DNA 抽提试剂盒 (生工生物工程 (上海) 股份有限公司) 进行总 DNA 的提取, 根据分光光度计 NanoDrop 2000c (Thermo Scientific) 检测的浓度结果对 DNA 母液进行稀释, 得到终浓度为 20 ~ 100 ng/ μ L 的工作液, 保存于 4 $^{\circ}$ C 冰箱备用。

1.3 微卫星标记的 PCR 扩增和片段长度检测

选用马怀雷 (2011) 开发的 11 个微卫星标记, 各标记位点的名称和引物序列等主要信息见表 2。各对引物分别在正向引物 5' 端进行 FAM 或 HEX 荧光标记 (表 2, 由上海生工合成)。PCR 体系及程

序等扩增实验操作信息见 Yan 等 (2017), 扩增结束后, 首先对扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳检测, 确定扩增出单一明亮的目标条带后送上海生工进行片段长度检测。利用 Peak Scanner 2.0 查看各样品

原始峰图, 对片段长度检测结果进行校核, 对检测结果中有明显噪音峰 (峰高大于主峰高度的 1/2) 或无信号的样品进行重新检测或重新扩增送样, 最后仍无信号或噪音峰仍明显的记为缺失数据。

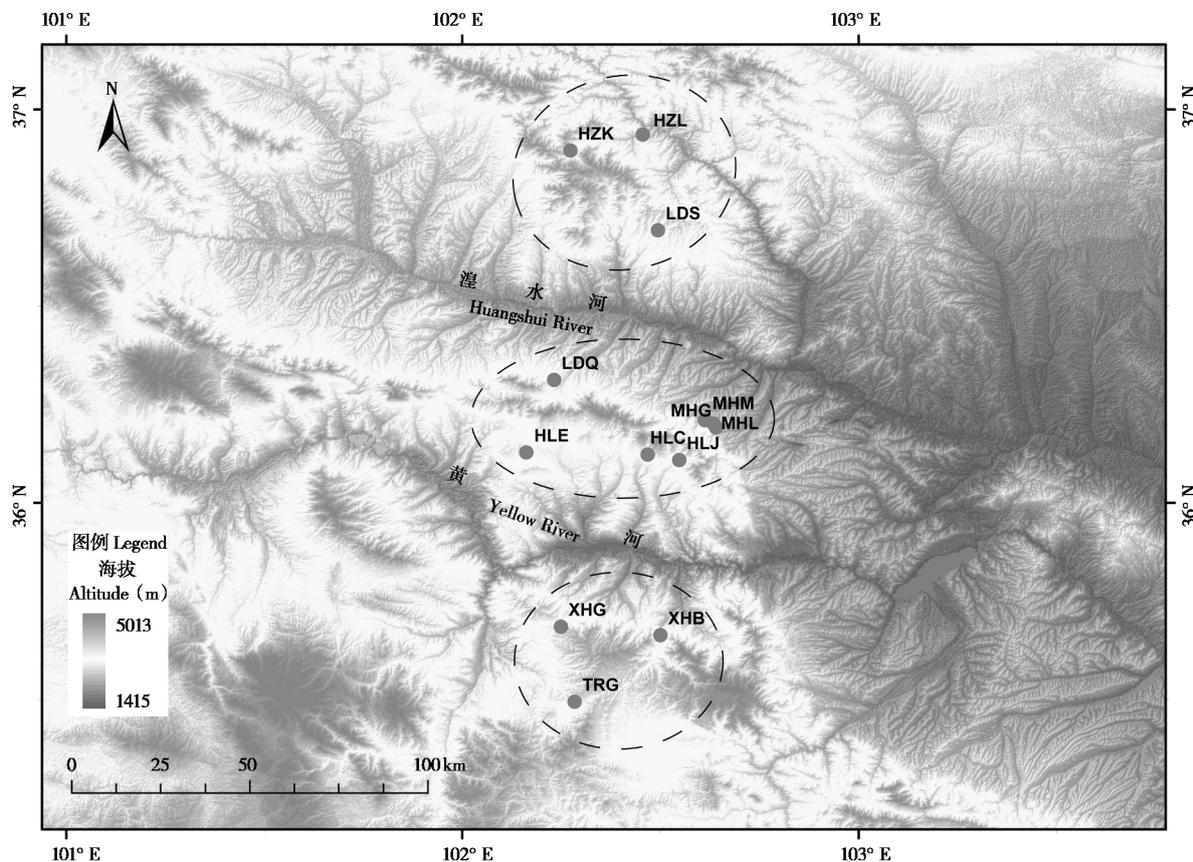


图 1 采样点分布图. HLC: 化隆县初麻乡; HLE: 化隆县二塘乡; HLJ: 化隆县金源乡; HZK: 互助县克麻沟; HZL: 互助县浪士当; LDQ: 乐都县瞿昙镇; LDS: 乐都县寿乐镇; MHG: 民和县西沟; MHL: 民和县李二堡镇; MMH: 民和县峡门镇; TRG: 同仁县瓜什则乡; XHB: 循化县白庄乡; XHG: 循化县岗察乡; 下同

Fig. 1 Geographical distribution of sampling sites. HLC: Chuma, Hualong; HLE: Ertang, Hualong; HLJ: Jinyuan, Hualong; HZK: Kemagou, Huzhu; HZL: Langshidang, Huzhu; LDQ: Qutan, Ledu; LDS: Shoule, Ledu; MHG: Xigou, Minhe; MHL: Lierbao, Minhe; MMH: Xiamen, Minhe; TRG: Guashize, Tongren; XHB: Baizhuang, Xunhua; XHG: Gangcha, Xunhua; the same below

表 1 种群信息表

Table 1 Information for sample populations

采样地点 Sampling site	种群编号 Code	样本数 Size	经度 Longitude (E)	纬度 Latitude (N)	海拔 Altitude (m)	观测杂合度 $H_o \pm SD$	期望杂合度 $H_e \pm SD$
化隆县初麻乡 Chuma, Hualong	HLC	37	102°28'01.3"	36°07'19.2"	3150	0.71 ± 0.10	0.69 ± 0.07
化隆县二塘乡 Ertang, Hualong	HLE	7	102°09'39.9"	36°07'40.2"	3223	0.69 ± 0.26	0.66 ± 0.20
化隆县金源乡 Jinyuan, Hualong	HLJ	11	102°32'48.8"	36°06'28.1"	3060	0.75 ± 0.22	0.67 ± 0.18
互助县克麻沟 Kemagou, Huzhu	HZK	11	102°16'19.0"	36°53'41.5"	2885	0.73 ± 0.25	0.69 ± 0.20
互助县浪士当 Langshidang, Huzhu	HZL	2	102°26'45.5"	36°56'06.8"	2769	0.67 ± 0.35	0.74 ± 0.21

续表 1 Continued from table 1

采样地点 Sampling site	种群编号 Code	样本数 Size	经度 Longitude (E)	纬度 Latitude (N)	海拔 Altitude (m)	观测杂合度 $H_o \pm SD$	期望杂合度 $H_e \pm SD$
乐都县瞿昙镇 Qutan, Ledu	LDQ	14	102°13'51.7"	36°18'43.8"	2984	0.58 ± 0.20	0.60 ± 0.19
乐都县寿乐镇 Shoule, Ledu	LDS	5	102°29'36.6"	36°41'32.0"	3091	0.67 ± 0.33	0.66 ± 0.21
民和县西沟乡 Xigou, Minhe	MHG	7	102°38'23.4"	36°11'27.7"	2518	0.67 ± 0.19	0.65 ± 0.16
民和县李二堡镇 Lierbao, Minhe	MHL	8	102°37'59.9"	36°12'02.4"	2514	0.78 ± 0.13	0.71 ± 0.09
民和县峡门镇 Xiamen, Minhe	MHM	3	102°36'42.2"	36°12'33.0"	2537	0.61 ± 0.29	0.76 ± 0.12
同仁县瓜什则乡 Guashize, Tongren	TRG	18	102°16'57.8"	35°29'38.0"	2890	0.74 ± 0.15	0.79 ± 0.07
循化县白庄乡 Baizhuang, Xunhua	XHB	5	102°29'59.0"	35°39'44.7"	2608	0.82 ± 0.19	0.76 ± 0.09
循化县岗察乡 Gangcha, Xunhua	XHG	21	102°14'53.9"	35°41'03.5"	3321	0.79 ± 0.14	0.74 ± 0.11

表 2 研究所用 11 个微卫星标记的主要信息

Table 2 Characteristics of 11 microsatellite loci used

位点 Locus	序列号 Accession number	重复单元 Repeat motif	引物序列 Primer sequence (5' → 3')	荧光标记 Fluorescent label	等位基因数 Allele number
B	JQ317689	(GT) ₁₆	F: TTTTGGCTAACATAGTGGT R: ACTGAAGCCTAAAGCAGAGT	FAM	9
D	JQ317691	(GT) ₁₉	F: ATGGGGACAAAACATGGGACT R: CGGTTGCTATGGAGACTGGA	HEX	6
E	JQ317692	(TC) ₂₄	F: CTTGTTTCAGGATTTGGCTAT R: AATGTCCTGAAAAATGGTGT	HEX	11
G	JQ317694	(AG) ₂₀	F: ATGGCAGAGAATATAAAAATGG R: CTGGTGGAACTTGTAGGAG	FAM	12
H	JQ317695	(GT) ₁₄	F: GGAAGACCACAGAGGAACAG R: CCTGAAGAGCAAGAGCATA	HEX	7
I	JQ317696	(TG) ₁₂	F: TAATATCCCCAAAGAAGTA R: TAGACCTTGCTGTGAAAAAT	HEX	8
J	JQ317697	(TG) ₁₂	F: ATGGGACAGAACTTTGATT R: CCTTATAGTTTACCTCCTCC	FAM	12
M	JQ317700	(AC) ₂₂	F: CATTGGAAGACAGAAAATACA R: CAGTCCTTTGAACTTGAGTA	FAM	11
R	JQ317704	(AC) ₁₁	F: ACAAACCTTCTTCGTCTC R: GTCTTCCACTACTCCTCT	FAM	6
T	JQ317706	(TG) ₁₁	F: AATAGCCAGTTCAACCTC R: ATGCTAACTTCAGCAACA	FAM	6
W	JQ317709	(CA) ₁₄	F: TTTCCACAGCAGCACTCT R: GGTTCCTTACCAGACCA	FAM	9

1.4 遗传结构分析

利用 STRUCTURE v2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000) 进行基于个体的贝叶斯法种群遗传结构分析, 系谱模型选择 admixture model, 等位基因频率模型选择 correlated allele frequencies model, 为确定最优聚类数 K 设置为 1 ~ 13, 上限即我们的采样点

数, 各 K 值分别运算 3 次, MCMC 总长为 550 000, 其中 burnin 为 50 000。运算结束后将结果提交至在线工具 STRUCTURE HARVESTER (Earl, 2012), 基于统计数 ΔK 评估出最佳聚类数。最后, 利用 CLUMPP v1.1.2 (Jakobsson and Rosenberg, 2007) 进行重复抽样, 优化最佳聚类结果中的归属系数

(membership coefficients), 利用 DISTRUCT v1.1 (Rosenberg, 2004) 完成绘图。

由于 STRUCTURE v2.3.4 为个体聚类, 其分析结果中以采样点为单位的地理种群可能出现聚类归属不明确的问题 (如本研究中的乐都瞿昙镇种群, LDQ), 因此本研究利用 BAPS v6.0 (Corander *et al.*, 2008) 中的空间群体聚类模块进行基于群体的种群遗传结构分析, 并对各群体样本的聚类不确定度进行评估, 主要参数如下: 选用固定 K (fixed K) 算法, 设置 $K=3$, 迭代数为 1 000。为进一步确定种群的亲缘关系和遗传结构, 本研究又进行了基于遗传距离的建树分析, 将数据导入 POPGENE v1.32 计算两两种群间的遗传相似性和遗传距离, 采用非加权配对算术平均法 UPGMA 构建系统树。之后, 利用 R v2.13.1 中的 “adeget” 程序包进行 DAPC (discriminant analysis of principal components, 即主成分判别分析, 不需要任何先验种群遗传模型) 分析 (Jombart *et al.*, 2010) 检验以上所获得的种群遗传结构中不同遗传聚类群的分离程度。最后将数据导入 ARLEQUIN v3.5 (Excoffier and Lischer, 2010) 进行种群遗传多样性指标, 即观测杂合度 (observed heterozygosity, H_o) 和期望杂合度 (expected heterozygosity, H_e) 的统计, 并根据已获得的种群结构对样本群进行分组, 完成 AMOVA 分析, 确定组间遗传差异的大小和显著性。

2 结果

2.1 研究地区喜马拉雅旱獭种群的遗传多样性

全部 149 份样品在 11 个微卫星标记位点共计检测到 97 个等位基因, 各位点均具有丰富的等位基因, 适合用于遗传多样性和遗传结构的研究。ARLEQUIN 统计结果显示, 13 个种群在全 11 个

微卫星位点的平均观测杂合度和期望杂合度范围分别为 0.58 ~ 0.82 和 0.60 ~ 0.79 (表 1)。

2.2 青海省东部地区喜马拉雅旱獭种群遗传结构

STRUCTURE HARVESTER 生成的 ΔK 曲线 (图 2) 表明, 最佳聚类数 $K=3$ 。当 $K=3$ 时, 根据 STRUCTURE v2.3.4 个体聚类结果中各种群的主要遗传背景判断 (图 3), 互助克麻沟 (HZK)、互助浪土当 (HZL) 和乐都寿乐镇 (LDS) 3 个种群聚为一支, 即 cluster 1; 乐都瞿昙镇种群 (LDQ)、化隆的 3 个种群 (HLC、HLE 和 HLJ) 以及民和的 3 个种群 (MHG、MHL 和 MHM) 聚为一支, 即 cluster 2; 而循化县白庄乡 (XHB) 和岗察乡 (XHG) 以及同仁县瓜什则乡 (TRG) 3 个种群聚为另一支, 即 cluster 3。该结果中其余 12 个种群的主要遗传背景都非常明显, 但乐都瞿昙镇种群中 8 个个体的主要遗传背景为 cluster 2, 另外 6 个个体则为 cluster 1, 种群主要遗传背景较模糊。

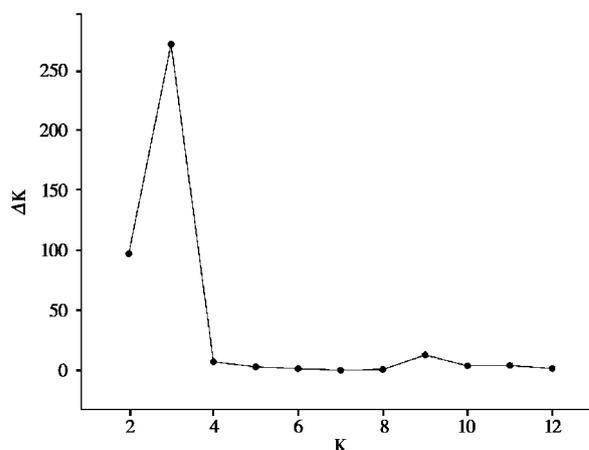


图 2 STRUCTURE HARVESTER 生成的 ΔK 曲线 (最佳聚类数 $K=3$)

Fig. 2 The ΔK curve generated by STRUCTURE HARVESTER. $K=3$ was estimated as the optimal

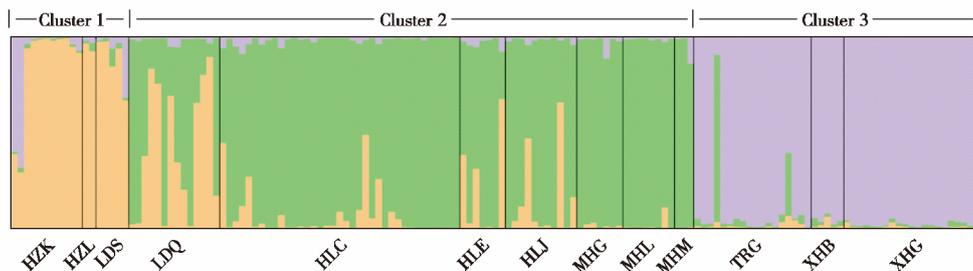


图 3 STRUCTURE 中 $K=3$ 时的贝叶斯个体聚类结果

Fig. 3 Results of Bayesian individual - based clustering in STRUCTURE with $K=3$

BAPS v6.0 的分析结果与 STRUCTURE v2.3.4 相一致 (图 4), 并清楚的显示 LDQ 种群属于 cluster 2, 且各种群的聚类不确定度都小于 0.05, 接近于 0, 表明研究区域内的喜马拉雅旱獭种群具有明显的遗传结构。基于遗传距离的 13 个喜马拉雅旱獭种群的 UPGMA 系统树再次证实了上述遗传结构, 且 HZK、HZL 和 LDS (即 cluster 1) 首先分离出来成为独立的一支, 与另外两个分支的遗传距离最大、亲缘关系最远 (表 3, 图 5)。将 cluster 1、cluster 2 和 cluster 3 分别编组后进行 DAPC 分析, 结果显示 3 个遗传群体完全分离, 表明群体之间差异明显 (图 6)。AMOVA 分析表明, 13 个喜马拉雅旱獭种群具有极显著的遗传分化 ($P < 0.00001$), 组间变异水平 (6.60%) 高于组内种群间变异 (4.51%), 而这两者都远低于种群内变异水平 (88.90%) (表 4)。

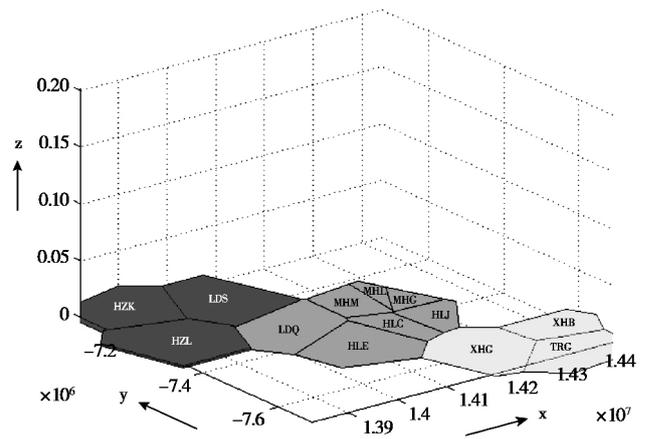


图 4 BAPS 群体聚类分析结果. 空间直角坐标系中 x-y 平面表示各种群的相对地理位置, z 轴表示各种群的聚类不确定度, 颜色表示聚类群
Fig. 4 Population clustering result in BAPS. The x-y plane in the space rectangular coordinate system shows the relative geographical locations of all populations; the z-axis indicates the local uncertainty of each population; colors indicate different clusters

表 3 喜马拉雅旱獭不同种群的 Nei's 遗传相似性 (对角线上方) 和遗传距离 (对角线下方)

Table 3 Nei's genetic identity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal) between different populations of *M. himalayana*

	HLC	HLE	HLJ	HZK	HZL	LDQ	LDS	MHG	MHL	MHM	TRG	XHB	XHG
HLC	****	0.849	0.878	0.680	0.547	0.821	0.635	0.832	0.913	0.881	0.752	0.703	0.698
HLE	0.164	****	0.842	0.649	0.553	0.761	0.678	0.751	0.802	0.817	0.747	0.675	0.729
HLJ	0.130	0.172	****	0.710	0.643	0.841	0.754	0.701	0.797	0.755	0.765	0.703	0.743
HZK	0.386	0.432	0.342	****	0.728	0.721	0.833	0.478	0.580	0.544	0.664	0.678	0.617
HZL	0.604	0.592	0.442	0.318	****	0.614	0.761	0.494	0.482	0.480	0.521	0.599	0.527
LDQ	0.197	0.273	0.174	0.327	0.488	****	0.681	0.668	0.788	0.692	0.659	0.610	0.610
LDS	0.454	0.388	0.283	0.183	0.273	0.384	****	0.599	0.591	0.564	0.700	0.599	0.693
MHG	0.184	0.286	0.355	0.739	0.704	0.404	0.512	****	0.918	0.924	0.669	0.555	0.656
MHL	0.091	0.221	0.227	0.545	0.729	0.238	0.525	0.085	****	0.926	0.708	0.660	0.695
MHM	0.126	0.203	0.282	0.609	0.734	0.368	0.573	0.079	0.077	****	0.715	0.644	0.660
TRG	0.286	0.291	0.268	0.409	0.652	0.417	0.357	0.402	0.345	0.336	****	0.839	0.923
XHB	0.353	0.393	0.353	0.389	0.513	0.494	0.513	0.588	0.416	0.440	0.176	****	0.786
XHG	0.360	0.316	0.297	0.484	0.641	0.495	0.366	0.422	0.364	0.415	0.080	0.241	****

3 讨论

3.1 青海省东部地区喜马拉雅旱獭种群的遗传多样性

关于喜马拉雅旱獭的遗传多样性, 国内已有一些学者进行过相关研究, Xu 等 (2009)、王琳琳等 (2008)、贺学等 (2012) 曾分别对乌兰、德令哈、沱沱河、安多、同仁以及玉树地区的种群进行过分析。本研究利用 11 对微卫星引物对青海省东部地区喜马拉雅旱獭种群的遗传多

样性水平进行了评价, 结果显示, 该地区喜马拉雅旱獭种群的平均观测杂合度 (H_o) 和期望杂合度 (H_e) 分别为 0.58 ~ 0.82 和 0.60 ~ 0.79, 与其它地区喜马拉雅旱獭遗传多样性的研究结果基本一致。其中, 本研究对 2014 年同仁县种群进行评价得出 H_o 为 0.74、 H_e 为 0.79, 与贺学等 (2012) 得出的 2009 年至 2010 年间该县旱獭种群的杂合度 (0.8207) 非常接近。而相比同属其它一些物种, 如旱獭 (*M. marmota*) (H_o : 0.25 ~ 0.68, H_e : 0.29 ~ 0.74) 和温哥华旱獭 (*M. vancouverensis*)

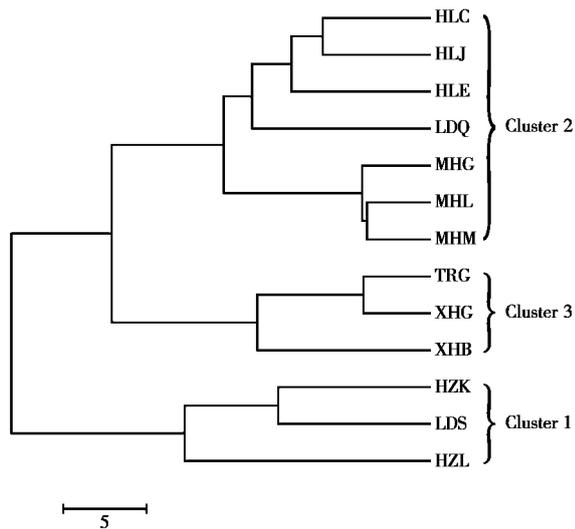


图5 基于遗传距离的喜马拉雅旱獭种群 UPGMA 系统树
Fig. 5 UPGMA dendrogram of *M. himalayana* populations based on the genetic distance

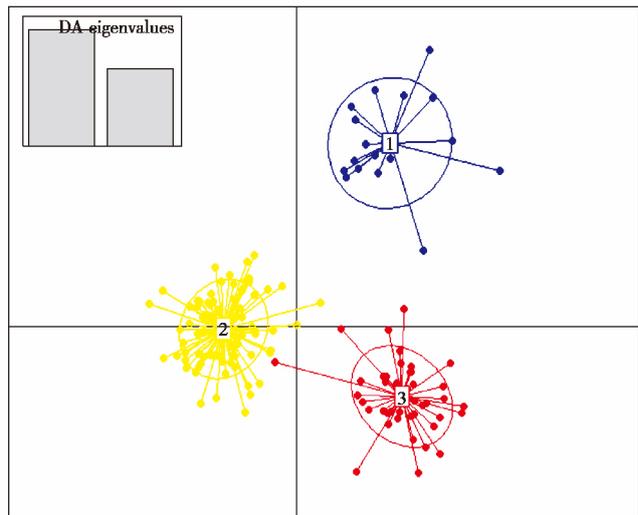


图6 DAPC 分析结果. 图中蓝色、黄色和红色圆点分别表示 cluster 1、cluster 2 和 cluster 3 中的个体
Fig. 6 Results of discriminant analysis of principal components. The blue, yellow and red dots indicate the individuals from cluster 1, cluster 2 and cluster 3, respectively

表4 喜马拉雅旱獭种群的分子变异分析 (AMOVA)

Table 4 Analysis of molecular variance (AMOVA) of *M. himalayana* populations

变异来源 Source of variation	自由度 <i>df</i>	平方和 Sum of squares	变异组分 Variance components	变异百分比 Percentage of variation	固定指数 Fixation indices	<i>P</i>
组间 Among groups	2	66.262	0.28505Va	6.60	$F_{CT} = 0.066$	<0.00001
组内种群间 Among populations within groups	10	77.898	0.19477Vb	4.51	$F_{SC} = 0.048$	<0.00001
种群内 Within populations	285	1094.752	3.84124Vc	88.90	$F_{ST} = 0.111$	<0.00001

(H_o : 0.07 ~ 0.29, H_e : 0.08 ~ 0.23) 等 (Da Silva *et al.*, 2006; Kruckenhauser *et al.*, 2009), 该地区喜马拉雅旱獭种群的遗传多样性处于相对较高的水平。尽管研究用微卫星标记并不相同, 部分差异也可能来源于不同标记位点的多态性差异, 但遗传多样性高说明种群具有较高的适合度, 这与野外观察到的喜马拉雅旱獭分布范围广、种群数量丰富等基本事实相一致。另一方面, 本文的研究范围为青海省东部地区, 人口较为密集, 但这并未对喜马拉雅旱獭的遗传多样性水平造成较大影响, 这与侍世梅等 (2008) 的研究结果, 即人为干扰因素是影响喜马拉雅旱獭生境选择的次要因子相一致。地理隔离阻碍基因交流进而导致局部种群遗传多样性水平降低, 但根据后文的讨论, 黄河和湟水河虽然

对喜马拉雅旱獭种群的基因交流具有明显阻隔作用, 但这种隔离并不是完全的, 且隔离时间也可能不长, 因此尚未对局部种群的遗传多样性造成太大影响。

3.2 河流对喜马拉雅旱獭种群基因交流的阻隔作用

综合各种分析方法得出的结果可以看出, 青海省东部地区的喜马拉雅旱獭种群存在显著的遗传分化和较强的遗传结构, 13 个地理种群由北向南分别形成了 3 个遗传聚类群, 即 cluster 1、cluster 2 和 cluster 3。结合该地区的地形地貌特征发现, 3 个遗传聚类群与湟水河和黄河上游干流所划分出的 3 个地理区块完全一致 (图 1), 因此, 我们认为湟水河干流和黄河上游干流对该地区喜马拉雅旱

獭种群的迁移扩散和基因交流有明显的地理阻隔作用,并最终导致其形成了稳定的遗传结构。河流对动物种群基因交流的阻隔作用一直是地理隔离研究中的焦点问题,葛艳丽等(2009)、刘翠霞等(2013)都曾研究过河流对高原鼠兔种群基因交流的影响并得出结论:河流并不能对高原鼠兔形成明显的隔离作用,这似乎与本研究结果相矛盾,特别是喜马拉雅旱獭体型远大于高原鼠兔,具有更强的迁移能力。进一步分析发现,葛艳丽等(2009)、刘翠霞等(2013)的研究范围主要位于青藏高原腹地,一年中有较长时间处于温度极低的冬季,大部分河流处于冰封期,没有冬眠习性的高原鼠兔可以在此时穿越冰面进行基因交流(刘天仇,1993;刘伟等,2009)。而本文的研究区域位于青藏高原边缘,海拔较低,温度相对较高,该区域内湟水河和黄河基本无冰封期(杨赉斐,1997),可能有冰情出现的11月至次年4月又恰好是喜马拉雅旱獭的冬眠期,这些因素使得喜马拉雅旱獭穿越河流进行基因交流的可能微乎其微,以致最终形成以湟水河和黄河上游干流为界的强烈的遗传结构。但根据STRUCTURE个体聚类的结果,3个遗传聚类群之间仍有明显的基因交流,AMOVA分析也显示3个聚类群间变异百分比为6.60%,仅略高于聚类群内种群间的变异(4.51%),而远低于种群内变异水平(88.90%),这说明3个聚类群间的分化程度不深。这是因为,喜马拉雅旱獭在青藏高原上数量众多,分布范围广阔而连续,湟水河和黄河干流并未对3个聚类群形成完全的封闭与隔离,沿湟水河和黄河的公路与桥梁也为喜马拉雅旱獭穿越河流创造了条件;另一方面,历史上这两条河流也经常出现枯水期(刘禹等,2006),加之根据已有报道,喜马拉雅旱獭可能具有游泳能力(马跃新等,1990),这些因素更增加了两岸种群发生大规模基因交流的可能,也解释了核基因水平上该地区喜马拉雅旱獭种群遗传结构明显而分化程度不深的原因。

3.3 青海省东部地区喜马拉雅旱獭种群监控及鼠疫防控的相关建议

根据本研究结果,湟水河与黄河上游干流是阻碍青海省东部地区喜马拉雅旱獭种群相互交流的天然屏障,使其形成了与两条河流所划分出的地理单元相一致的遗传结构,建议在该地区今后的旱獭种

群监控和鼠疫防控相关工作中,可以考虑将湟水河和黄河上游干流3个地理区块作为独立监控单元部署相关工作。但鉴于3个地理区块的旱獭种群之间仍然存在基因流,因此,如果局部出现疫情,还要密切防范各种可能的旱獭扩散途径,严防疫情传播。

参考文献:

- Chen Y, Wang Z, Zhang G, Fan W, Tao Y, He X, Zhao S, Huang B, Fan J, Shuji K, Liu E. 2012. Genetic characterization of four wild species of Chinese marmots using microsatellite markers. *Biologia*, **67** (5): 1013–1017.
- Corander J, Martinen P, Sirén J, Tang J. 2008. Enhanced Bayesian modelling in BAPS software for learning genetic structures of populations. *BMC Bioinformatics*, **9** (1): 539.
- Da Silva A, Luikart G, Yoccoz N, Cohas A, Allaine D. 2006. Genetic diversity – fitness correlation revealed by microsatellite analyses in European alpine marmots (*Marmota marmota*). *Conservation Genetics*, **7** (3): 371–382.
- Earl D A. 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, **4** (2): 359–361.
- Excoffier L, Lischer H E. 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, **10** (3): 564–567.
- Gage K L, Kosoy M Y. 2005. Natural history of plague: perspectives from more than a century of research. *Annu Rev Entomol*, **50**: 505–528.
- Ge Y L, Lin G H, Ci H X, Zhang T Z, Tang L Z, Su J P. 2009. Genetic diversity and differentiation of *Ochotona curzoniae* based on ISSR and Cyt b gene. *Chinese Journal of Zoology*, **44** (4): 34–40. (in Chinese)
- He X, Wang Z D, Tao Y Q, Fan W, Zhang G W, Huang B Q, Chen Y L, Liu E Q. 2012. Genetic polymorphism of *Marmota himalayana* populations in Qinghai Province using microsatellite markers. *Chinese Veterinary Science*, **42** (06): 627–631. (in Chinese)
- Jakobsson M, Rosenberg N A. 2007. CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics*, **23** (14): 1801–1806.
- Jombart T, Devillard S, Balloux F. 2010. Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC Genetics*, **11** (1): 94.
- Kruckenhausler L, Pinsker W, Haring E, Arnold W. 1999. Marmot phylogeny revisited: molecular evidence for a diphyletic origin of sociality. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, **37** (1): 49–56.
- Kruckenhausler L, Bryant A A, Griffin S C, Amish S J, Pinsker W. 2009. Patterns of within and between – colony microsatellite varia-

- tion in the endangered Vancouver Island marmot (*Marmota vancouverensis*): implications for conservation. *Conservation Genetics*, **10** (6): 1759–1772.
- Li Y, Wang Z, Tao Y, Fan W, Li M, Huang B, Zhao S, Fan J, Liu E. 2012. Characteristics of Himalayan marmots and their response to an atherogenic diet. *Experimental Animals*, **61** (4): 461–466.
- Liu C X, Su J P, Zhang T Z, Lin G H. 2013. The effect of Qingzang-Tibet Plateau geographical barrier on plateau pika population differentiation. *Sichuan Journal of Zoology*, **32** (5): 651–657. (in Chinese)
- Liu W, Zhang Y, Wang X, Zhao J Z, Xu Q M, Zhou L. 2009. Food selection pattern for plateau pika in winter. *Acta Theriologica Sinica*, **29** (1): 12–19. (in Chinese)
- Liu Y, Yang Y K, Cai Q F, Ma H Z, Shi J F. 2006. June to July runoff reconstruction for Huangshui River from tree ring width for the last 248 years. *Journal of Arid Land Resources and Environment*, **20** (6): 69–73. (in Chinese)
- Luo X Z, Hai R. 2010. An overview of the epidemiological characteristics of *Marmota himalayana* plague on Qinghai-Tibet Plateau. *Chin J Vector Biol and Control*, **21** (4): 394–398. (in Chinese)
- McKean T, Mendenhall W. 1996. Comparison of the responses to hypoxia, ischaemia and ischaemic preconditioning in wild marmot and laboratory rabbit hearts. *Journal of Experimental Biology*, **199** (3): 693–697.
- Menne S, Cote P J. 2007. The woodchuck as an animal model for pathogenesis and therapy of chronic hepatitis B virus infection. *World Journal of Gastroenterology*, **13** (1): 104.
- Nikol'skii A, Rumiantsev V Y. 2012. Center of species diversity of Eurasian marmots (*Marmota*, Rodentia) in an epi-platfomal orogeny area. *Doklady Biological Sciences*, **445** (1): 261–264.
- Perry R D, Fetherston J D. 1997. *Yersinia pestis* – etiologic agent of plague. *Clinical Microbiology Reviews*, **10** (1): 35–66.
- Pritchard J K, Stephens M, Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, **155** (2): 945–959.
- Rosenberg N A. 2004. DISTRUCT: a program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology Notes*, **4** (1): 137–138.
- Shi S M, Liu F Y, Yan X B. 2008. Habitat selection by *Marmota himalayana* in the eastern Qilian Mountains. *Journal of Gansu Agricultural University*, **43** (1): 125–130. (in Chinese)
- Steppan S J, Storz B L, Hoffmann R S. 2004. Nuclear DNA phylogeny of the squirrels (Mammalia: Rodentia) and the evolution of arboreality from *c-myc* and *RAG1*. *Mol Phylogenet Evol*, **30** (3): 703–719.
- Wang L L, Xu J H, Qin Z, Wang Y S, Xu L X. 2008. Genetic diversity of microsatellite loci in *Marmota himalayana*. *Journal of Qufu Normal University*, **34** (4): 101–104. (in Chinese)
- Xu J, Wang L, Xue H, Wang Y, Xu L. 2009. Genetic structure of Himalayan marmot (*Marmota himalayana*) population alongside the Qinghai-Tibet Railway. *Acta Ecologica Sinica*, **29** (5): 314–319.
- Yan J, Chen H, Lin G, Li Q, Chen J, Qin W, Su J, Zhang T. 2017. Genetic evidence for subspecies differentiation of the Himalayan marmot, *Marmota himalayana*, in the Qinghai-Tibet Plateau. *PLoS ONE*, **12** (8), e0183375.
- Zhang A N, Liu L, Zhang Y Z. 2002. Dynamic observation of quantity of fleas on *Marmota himalayana* in certain area of eastern Qilian Mountain. *Chin J Ctrl Endem Dis*, **17** (6): 369–371. (in Chinese)
- Zheng Y, Zhang A P, Li Q, Wang X, Chen H J, Zhang X F, Wang Z Y. 2017. Epidemiological characteristics of human plague in Qinghai Province. *Capital Journal of Public Health*, **11** (2): 50–52. (in Chinese)
- 马怀雷. 2011. 小尺度范围喜马拉雅旱獭家族之间个体迁移的研究. 北京: 中国疾病预防控制中心硕士学位论文.
- 马跃新, 张国强, 马俊杰, 杨小平, 张才德. 1990. 灰旱獭生态拾零. *地方病通报*, **5**: 88.
- 王琳琳, 徐金会, 秦桢, 王玉山, 徐来祥. 2008. 三个微卫星标记在喜马拉雅旱獭种群中的遗传多态性. *曲阜师范大学学报*, **34** (4): 101–104.
- 刘天仇. 1993. 雅鲁藏布江冰情. *西藏大学学报*, **8** (1): 37–42.
- 刘伟, 张毓, 王溪, 赵建中, 许庆民, 周立. 2009. 高原鼠兔冬季的食物选择. *兽类学报*, **29** (1): 12–19.
- 刘禹, 杨银科, 蔡秋芳, 马海洲, 史江峰. 2006. 以树木年轮宽度资料重建湟水河过去 248 年来 6–7 月份河流径流量. *干旱区资源与环境*, **20** (6): 69–73.
- 刘翠霞, 苏建平, 张同作, 林恭华. 2013. 青藏高原的地理屏障在高原鼠兔种群分化中的作用. *四川动物*, **32** (5): 651–657.
- 杨赉斐. 1997. 黄河上游冰情及其研究. *西北水电*, **60**: 1–5.
- 张安宁, 刘麟, 张玉贞. 2002. 东祁连山某部喜马拉雅旱獭蚤类数量观察. *中国地方病防治杂志*, **17** (6): 369–371.
- 尚国宝, 魏荣杰, 杨永海, 张爱萍, 赵忠志, 吴海莲, 吴海生, 陈刚, 吴树生, 唐新元, 田富彰, 王虎, 王祖郎. 2015. 青海地区喜马拉雅旱獭鼠疫风险评估研究. *中国卫生统计*, **32** (4): 661–665.
- 侍世梅, 刘发央, 严学兵. 2008. 东祁连山喜马拉雅旱獭生境的选择. *甘肃农业大学学报*, **43** (1): 125–130.
- 郑谊, 张爱萍, 李千, 王雪, 陈洪舰, 张雪飞, 王祖郎. 2017. 青海省人间鼠疫流行病学分析. *首都公共卫生*, **11** (2): 50–52.
- 贺学, 王忠东, 陶元清, 范薇, 张光伟, 黄炳俏, 陈玉龙, 刘恩岐. 2012. 青海省喜马拉雅旱獭种群的遗传多态性分析. *中国兽医科学*, **42** (06): 627–631.
- 骆孝志, 海荣. 2010. 青藏高原喜马拉雅旱獭鼠疫流行特征研究概况. *中国媒介生物学及控制杂志*, **21** (4): 394–398.
- 葛艳丽, 林恭华, 慈海鑫, 张同作, 唐利洲, 苏建平. 2009. 基于 ISSR 标记和线粒体 *Cyt b* 基因分析高原鼠兔的遗传多样性及其遗传分化. *动物学杂志*, **44** (4): 34–40.