

鲸类保护遗传学研究进展*

刘 珊 杨 光**

(南京师范大学生命科学学院遗传资源研究所 南京 210097)

摘要: 简要介绍了 mtDNA 的 PCR 直接测序、微卫星 microsatellite DNA 分型、组织相容性复合体 (major histocompatibility complex, MHC) 分析等 DNA 分子标记技术在鲸类遗传变异、种群结构、进化历史、个体识别、亲缘鉴定及系统分类等保护遗传学领域的应用。

关键词: 分子标记技术; 鲸类; 保护遗传学

中图分类号: Q349.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2002)05-83-04

A Review of the Conservation Genetics of Cetaceans

LIU Shan YANG Guang

(Institute of Genetic Resources, Nanjing Normal University Nanjing 210097, China)

Abstract: This paper reviews the principles of several molecular marker techniques, including PCR-directed sequencing for mitochondrial DNA, microsatellite genotyping, and major histocompatibility complex (MHC) analysis, and the application of these techniques in conservation genetics, e. g. genetic variation, population structure, population evolutionary history, individual identification, and the phylogenetic systematics of cetaceans.

Key words: Molecular marker technique; Cetacean; Conservation genetics

鲸类广泛分布于全世界海洋和部分江河之中, 长期以来由于非法捕猎、栖息地生境的持续性恶化(如环境污染)以及渔业误捕等众多因素的影响, 数量大幅度下降, 其中白暨豚 (*Lipotes vexillifer*)、加湾鼠豚 (*Pbocoena sinus*)、北真鲸 (*Eubalaena glacialis*) 等已濒临灭绝^[1]。对鲸类的保护已引起国际社会和公众的广泛关注。但鲸类生活在水中, 数量少, 密度低, 活动范围广, 用传统方法发现和追踪它们相当困难。近年来, 随着 DNA 分子生物学技术的发展, 可从极少量的组织材料中获取 DNA 标记进行遗传变异、种群结构、进化历史、个体识别、亲缘鉴定、系统分类等保护遗传学方面的研究^[2,3], 在鲸类中得到了广泛的应用。

1 鲸类保护遗传学研究中常用的 DNA 标记技术

1.1 PCR 产物直接测序技术 聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 产物直接测序技术最能充分展示所测基因片段的多态性, 且操作方便, 对材料要求

低, 在鲸类保护遗传学研究中有着广泛的应用^[4]。特别是近年来随着非损伤取样 (noninvasive or nondestructive sampling) 技术的建立, 已从馆藏标本、脱落的鲸须、剥脱的皮肤组织、甚至粪便等中提取 DNA 用于研究^[3], 解决了鲸类研究受样品来源限制的问题。PCR 产物的直接测序技术主要在线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 分析中得到应用。通过测定一定数量个体 mtDNA 变异程度较高的控制区 (control region 或 D-loop) 序列, 可以揭示种群的遗传变异及多样性程度, 为种群管理单元的划分提供依据。而 mtDNA 细胞色素 *b* 以及 12S 和 16S rRNA 及一些核 DNA 基因进化速率适中, 适用于探讨鲸类的起源进化和系统发生^[5-7]。

* 国家自然科学基金 (No. 39800014, No. 30070116), 江苏省教委自然科学基金 (No. JW970122) 资助;

** 联系人, E-mail: gyang@njnu.edu.cn;

第一作者介绍 刘珊, 女, 26 岁, 硕士/博士研究生; 研究方向: 动物学、分子生物学。

收稿日期: 2001-10-05, 修回日期: 2002-01-12

1.2 微卫星 DNA 标记技术 微卫星 DNA(microsatellite DNA)是基因组中一些包含不同数量的简单串联重复序列,重复单元的长度一般为 1~6 bp。由于微卫星重复序列的两侧序列保守,故而可以据此设计引物并应用 PCR 技术进行分型。微卫星标记以其丰富的多态性,分析技术的简便性以及实验样品和仪器设备的要求较低等特点,已成为保护遗传学和分子生态学领域使用最广泛的分子遗传标记技术之一,在研究遗传多样性、种群结构、个体识别、亲子鉴定等方面^[6-10]都有应用。

1.3 MHC 标记技术 主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)是脊椎动物体内和免疫功能密切相关的一个基因家族,是基因组中多态性最为丰富的区域之一。MHC 的表达产物广泛参与各种抗原的识别,其多样性水平的降低可导致种群内个体对突发性的传染病原体的易感性增高,造成种群抗病能力单一,生存力下降,因此运用 MHC 分析来进行濒危物种的保护遗传学研究,已逐渐成为热点^[11]。

目前对 MHC 的分析主要是基于 PCR。对 PCR 产物既可以进行单链构象多态(single-stranded conformation polymorphism, SSCP)分型,也可进行 RFLP 分析,但最主要、也是最有效的方法还是序列测定与分析。由于 MHC 作为变异程度很高的核 DNA 基因,对每一个体(特别是杂合体),一般需要测定 5~7 个克隆的序列,方能保证来自双亲的两个等位基因的序列都被测出。显然,对大样本的种群分析来说,工作量将是惊人的。为此,通过 SSCP 技术对目的片段的 PCR 扩增产物先进行分型,对不同 SSCP 型只需选择其中的一个或少数几个个体进行序列测定,即可在基本不减少信息量的情况下大大减少工作量^[12]。

1.4 其它技术 除了以上介绍的几种常见的分子标记技术外,还有等位酶(allozyme)、限制性片段长度多态性(RFLP)、随机引物扩增 DNA 多态性(radom amplified polymorphism of DNA, RAPD)和小卫星(minisatellite)技术等^[13-15],由于它们在鲸类保护遗传学研究中较少用到,故不赘述。此外,近来还有学者利用短散在元件(short interspersed element, SINE)反转录转座的不可逆性可作为生物进化过程中的标记,探讨鲸类的起源和系统发生^[16]。

2 鲸类保护遗传学研究进展

2.1 遗传变异和种群结构 在鲸类资源管理和种群保护中,种群遗传多样性与遗传结构分析一直是一个倍受关注的热点,因为它是确定种群保护管理单元(management unit or stock)及保护等级的基础。如 Hoelzel

等^[17]对分布于加里弗尼亚海湾的两个虎鲸(*Orcinus orca*)种群的研究发现,这两个同域分布的种群间有着显著的遗传分化和种群结构,而各个种群内的遗传多样性水平却很低。这可能是两个虎鲸种群因取食对策和社群行为的不同而相互隔离后造成的,提示在实施对虎鲸的资源管理和保护时,需要把这两个同域种群分别作为不同的管理单元对待。

将母系遗传的线粒体 DNA 分析与双亲遗传的核 DNA 分析相结合,能从不同角度客观地反映种群间和种群内的遗传分化情况,是鲸类保护遗传学研究的一个重要趋势,但有时会出现两种分析结果的不一致。如 Rosel 等^[4]通过 mtDNA 控制区序列分析发现,大西洋西北的 4 个港湾鼠豚(*Phocoena phocoena*)夏季繁殖种群间在遗传组成上有显著的分化,但运用微卫星技术却探测不到。当仅分析雌性群体的遗传组成时,不同种群间的分化和隔离表现尤为明显,而当仅分析雄性群体的遗传组成时,种群分化程度较低且相应的每代迁移数较高,提示不同繁殖群间的基因交流主要是由雄性介导的,而雌性群体较少发生迁移。因此使用母系遗传的 mtDNA 分析能追踪母系的起源,敏感地探测到种群间存在的遗传结构,而核基因分析有时却不能。还有一种解释就是,这些港湾鼠豚繁殖群建立的时间可能较迟(各个港湾在末次冰期曾为冰川所覆盖),因此相互间的遗传分化的显著性还没有达到使用核基因组能检测出的程度。

鲸类的社群结构和迁移繁殖行为等也与鲸类种群结构的形成紧密相关。Richard 等^[10]通过微卫星、性连锁遗传标记和 mtDNA 序列分析证实了抹香鲸(*Physeter macrocephalus*)种群具有母系集群生活的亲缘关系模式。Amos 等^[18]通过微卫星指纹技术发现长肢球头鲸(*Globicephala melas*)的鲸群内两种性别的后代都不迁移,交配繁殖一般发生在两个或多个家族群(pods)偶尔短暂的相遇和混合时。由于每个家族群都并非是一个单一的代表独特遗传组分的进化支系,不同家族群之间随机相关,因此要保护长肢球头鲸的遗传多样性,需划定的保护范围将是很大的。

应用 MHC 基因进行鲸类的保护遗传学研究虽然还不多,但可能是今后的一个重要发展方向,因为 MHC 基因的遗传多态性在评估关于种群的特定问题(如对疾病的耐受能力)可以发挥特殊的重要作用。Murray 等^[19]与 Murray 和 White^[20]通过 MHC II DQB 和 DRB 基因的第二外显子序列分析了白鲸的遗传多样性与种群结构,发现白鲸的 MHC 序列多态性低于陆生脊椎动物,而且不同种群的等位基因频率不同,可以进行种群结

构分析。

2.2 种群动态和进化历史 PCR技术使从馆藏的历史标本中获取陈旧DNA成为可能,通过分析这些陈旧DNA并与现生种群的遗传组成比较,可以推断种群历史上经历过的或预测将来的种群动态变化。通过分析馆藏和现生标本, Pichler和Baker^[21]发现新西兰弓海豚(*Cephalorhynchus hectori*)在过去的20年中遗传多样性明显降低。其中北岛种群的单倍型多样性从过去的0.41或更高降低到0,灭绝风险极大;南岛东部种群单倍型多样性从0.65降到0.35,预计在未来的20年中其遗传多样性将会全部丧失。这证实了人类经济活动造成的弓海豚栖息地的衰退和种群数量的减少已严重危及到弓海豚的生存了。弓头鲸(*Balaena mysticetus*)白令海峡-楚克奇-波弗特海(Bering-Chukchi-Beaufort Seas, BCB)种群一度曾因捕猎数量剧减,有人推测其遗传多样性也因之遭到损失。然而Rooney等^[8]通过20个微卫星位点进行的遗传多样性和杂合度分析却发现,BCB种群遗传多样性水平普遍较高。杂合子过量(heterozygosity excess)检验和等位基因频率分布(allele frequency distribution)检验也提示这一种群在近期内不太可能受到过瓶颈效应的影响。

2.3 物种鉴定和个体识别 现生喙鲸科(Ziphiidae)中许多种类形态上十分相似,为鉴定分类工作带来困难。通过使用一些分子遗传学的手段如序列分析,能提高鉴定的准确性。Dalebout等^[22]利用mtDNA控制区序列数据库,对新西兰和南澳大利亚海滩搁浅的20头喙鲸进行鉴定的结果发现,20%(4头)的个体最初的形态鉴定有误,并发现了一个可能的喙鲸新种。此方法还可用于鉴定市场上公开出售的鲸肉及其制品,以监测捕捞渔业对鲸类的影响^[23]。

在个体识别上,DNA指纹技术以其高度灵敏性可望成为继照相识别技术后又一进行鲸类野外调查研究的有力工具。Palsboll等^[3]运用此技术对北大西洋不同繁殖场和食物场的3060号大翅鲸(*Megaptera novaeangliae*)的皮肤样品6个微卫星位点进行分析,确定其中有692号为二次捕获(recapture)。此外,他们还第一次单凭遗传学资料对该水域大翅鲸的种群数量进行了估计。

2.4 鲸类的饲养繁殖及遗传管理 在鲸类饲养繁殖中,为建立能代表野生种群遗传组成的饲养群体和防止近交衰退,需要进行创立者种群遗传多样性的评估和个体间的亲缘鉴定,辨别出那些具有独特而稀有的基因型的个体,建立新的家系。分子标记技术能方便地评估饲养种群的遗传多样性和实施亲子鉴定,从而

获得准确的遗传谱系。Rooney等^[9]运用微卫星位点TexVet3和TexVet7成功地对饲养下的瓶鼻海豚(*Tursiops sp.*)进行了亲子鉴定。对不同饲养地的瓶鼻海豚遗传组成的分析发现,瓶鼻海豚饲养群遗传组成普遍单一、多样性程度偏低,这对于生活在狭小空间、种群密度高的环境中的瓶鼻海豚饲养群的生存是不利的,容易发生近交衰退或集体感染疾病事件。这一结果对瓶鼻海豚饲养群的遗传管理有实际意义。

2.5 分类与系统发生 基于分子标记技术的鲸类系统发生与分类研究是近年来鲸类生物学研究中的热点之一。已有的研究涉及到鲸类的发生及鲸类不同类群(特别是抹香鲸类和淡水豚类)或物种的系统学等。如现生淡水豚类的分类和系统发生一直存在颇多争议,先后有学者通过mtDNA cyt b 12S和16S等mtDNA基因及核基因组中的SINEs对此进行研究,并为淡水豚类的非单系发生及隶属于不同科的观点提供了有力的分子证据^[5,6,16,24-27]等。瑞典的U. Arnason研究小组与比利时的M. Milinkovitch研究小组曾就抹香鲸类的系统发生关系展开了激烈的学术争论^[5,28]。虽然至今关于抹香鲸类是与齿鲸类还是与须鲸类有更近的亲缘关系尚无定论,但这并非表明DNA分子技术在解决这一问题是无能为力的,而是由于这一问题本身非常复杂。此外,分子标记技术在解决瓶鼻海豚(genus *Tursiops*)分类这一世界性难题中发挥了重要的作用。Wang等^[29]正是通过mtDNA控制区序列变异的分析,为瓶鼻海豚分为两个种,即*T. truncatus*和*T. aduncus*,提供了确凿的分子证据,得到鲸类学界的广泛认可。

3 结语和展望

DNA分子标记技术的迅猛发展极大地推动着新兴的鲸类保护遗传学研究的开展和不断深入。短短十多年里,用分子标记手段研究的种类已从无到有拓展到港湾鼠海豚、瓶鼻海豚、真鲸、长肢球头鲸、虎鲸、抹香鲸、弓头鲸、大翅鲸等许多物种,范围遍及全世界各大水域。随着研究的深入,人们已经开始意识到了人类活动和环境污染会对鲸类的种群结构、遗传多样性、分布、迁移繁殖造成重大影响,并试图对相关问题的分子形成机制作出解释^[21]。相信今后随着鲸类研究对象的逐步增加和研究水域的扩大,以及对特定水域鲸类种群特征和环境特征的结合分析,我们能就人类活动对鲸类的影响作出准确客观的评估,并最终促进对鲸类的保护。

参 考 文 献

[1] Reeves R R, Leatherwood S. Dolphins, Porpoise and Whales:

- 1994 - 1998 Action Plan for the Conservation of Cetaceans. IUCN Species survival Commission, IUCN, Gland, Switzerland, 1994.
- [2] Parker P G, Snow A A, Schug M D *et al.* What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. *Ecology*, 1998, **79**(2): 361 ~ 382.
- [3] Palsboll P J, Allen J, Berube M *et al.* Genetic tagging of humpback whales. *Nature*, 1997, **388**(21): 767 ~ 769.
- [4] Rosel P E, France S C, Wang J Y *et al.* Genetic structure of harbour porpoise, *Phocoena phocoena*, populations in the northwest Atlantic based on mitochondrial and nuclear markers. *Mol Ecol*, 1999, **8**(12): 41 ~ 54.
- [5] Arnason U, Gullberg A. Cytochrome-*b* nucleotide sequences and the identification of five primary lineages of extant Cetaceans. *Mol Bio Evol*, 1996, **13**(2): 407 ~ 417.
- [6] Cassens I, Vicario S, Waddell V G *et al.* Independent adaptation to riverine habitats allowed survival of ancient cetacean lineage. *PNAS*, 2000, **97**(21): 11 343 ~ 11 347.
- [7] Arnason U, Gullberg A, Gretarsdottir S *et al.* The mitochondrial genome of the sperm whale and a new molecular reference for estimating eutherian divergence dates. *J Mol Evol*, 2000, **50**(6): 569 ~ 578.
- [8] Rooney A P, Honeycutt R L, Davis S K *et al.* Evaluation a putative bottleneck in a population of bowhead whales from patterns of microsatellite diversity and genetic disequilibria. *J Mol Evol*, 1999a, **49**(5): 682 ~ 690.
- [9] Rooney A P, Merritt D B, Derr J N. Microsatellite diversity in captive bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *J Hered*, 1999b, **90**(1): 228 ~ 231.
- [10] Richard K R, Dillon M C, Whitehead H *et al.* Patterns of kinship in groups of free-living sperm whales (*Physeter macrocephalus*) revealed by multiple molecular genetic analyses. *PNAS*, 1996, **93**: 8 792 ~ 8 795.
- [11] Hedrick P W. Evolution genetics of the major histocompatibility complex. *American Naturalists*, 1994, **143**: 945 ~ 964.
- [12] Sunnucks P, Wilson A C, Beheregaray L B *et al.* SSCP is not so difficult: the application and utility of single-stranded conformation polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology. *Mol Ecol*, 2000, **9**: 1 699 ~ 1 710.
- [13] Wada S, Numachi K I. Allozyme analysis of genetic differentiation among the populations and species of the Balaenoptera. *Report of International Whaling Commission, Special Issue*, 1991, **13**: 125 ~ 144.
- [14] Dowling T E, Brown W M. Population structure of the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) as determined by restriction endonuclease analysis of mitochondrial DNA. *Mar Mamm Sci*, 1993, **9**(2): 138 ~ 155.
- [15] Schaeff C M, Kraus S D, Brown M W *et al.* Comparison of genetic variability of North and South right whales (*Eubalaena*), using DNA fingerprinting. *Can J Zool*, 1997, **75**: 1 073 ~ 1 080.
- [16] Normile D. River dolphins add branches to family tree. *Science*, 2001, **291**: 2 531 ~ 2 532.
- [17] Hoelzel A R, Dahlheim M, Stern S J. Low genetic variation among killer whales (*Orcinus orca*) in the eastern north pacific and genetic differentiation between foraging specialists. *J Hered*, 1998, **89**: 121 ~ 128.
- [18] Amos B, Schlotterer C, Tautz D. Social structure of pilot whales revealed by analytical DNA profiling. *Science*, 1993, **260**: 670 ~ 672.
- [19] Murray B W, Malik S, White B N. Sequence variation at the major histocompatibility complex DRB loci in beluga (*Delphinapterus leucas*) and narwhal (*Monodon monoceros*). *Immunogenetics*, 1998, **48**(4): 242 ~ 252.
- [20] Murray B W, White B N. Sequence variation at the major histocompatibility complex locus DQ beta in beluga whales (*Delphinapterus leucas*). *Mol Biol Evol*, 1995, **12**(4): 582 ~ 593.
- [21] Pichler F B, Baker C S. Loss of genetic diversity in the endemic Hector's dolphin due to fisheries-related mortality. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 2000, **267**(1 438): 97 ~ 102.
- [22] Dalebout M L, Van Helden A, Van Waerebeek K *et al.* Molecular genetic identification of southern hemisphere beaked whales (Cetacea: Ziphiidae). *Mol Ecol*, 1998, **7**: 687 ~ 694.
- [23] Lento G M, Dalebout M J, Baker C S. Market survey, 1999: molecular genetic identification of whale and dolphin products for sale in Japan and Korea. Report (SC/52/SD17) to the Scientific Committee of the International Whaling Commission. 2000.
- [24] Yang G, Zhou G K, Ren W H *et al.* Molecular systematics of river dolphins inferred from complete mitochondrial cytochrome-*b* gene sequences. *Marine Mammal Science*, 2002, **18**(1): 1 ~ 9.
- [25] 刘珊, 杨光, 周开亚等. 淡水豚类 mtDNA 16S rRNA 基因的系统发生. 南京师范大学学报, 2000, **23**(3): 74 ~ 79.
- [26] 杨光, 刘珊, 季国庆等. 淡水豚类线粒体 DNA 12S rRNA 基因的序列变异及其分子系统学研究. 动物学研究, 2000, **21**(6): 425 ~ 431.
- [27] Nikaïdo M, Matsuno F, Hamilton H. Retroposon analysis of major cetacean lineages: The monophyly of toothed whales and the paraphyly of river dolphins. *PNAS*, 2001, **98**(13): 7 384 ~ 7 389.
- [28] Milinkovitch M, Meyer C A, Powell J R. Phylogeny of all major groups of Cetaceans based on DNA sequences from three mitochondrial genes. *Mol Bio Evol*, 1994, **11**(6): 939 ~ 948.
- [29] Wang J Y, Chou L S, White B N. Mitochondrial DNA analysis of sympatric morphotypes of bottlenose dolphins (genus: *Tursiops*) in Chinese waters. *Mol Ecol*, 1999, **8**: 1 603 ~ 1 612.