

天鹅洲迁地保护江豚种群近亲繁殖状况评估

陈敏敏^{①②} 郑劲松^{①*} 龚 成^③ 赵庆中^① 王 丁^{①*}

① 中国科学院水生生物多样性与保护重点实验室, 中国科学院水生生物研究所 武汉 430072; ② 中国科学院大学 北京 100049; ③ 湖北长江天鹅洲白暨豚国家级自然保护区管理处 石首 434400

摘要: 长江江豚(*Neophocaena asiaeorientalis asiaeorientalis*)已处于极度濒危状况, 迁地保护被认为是避免其灭绝最有希望的保护措施。本文选用 21 个多态性微卫星标记对 2010 年 10 月天鹅洲迁地保护江豚种群进行了亲子鉴定和亲缘关系分析, 以检测该种群的近亲繁殖状况, 为种群管理提供参考信息。本研究从 18 个个体中检测到 3 个父-母-子家庭, 以及母子和父子各 1 对。由于检测到的亲子关系较少, 单从亲子鉴定结果不能判断该种群是否存在近亲繁殖。然而, 亲缘关系分析结果表明, 该迁地保护江豚种群的平均亲缘系数 r 为 0.118 2, 候选亲本间亲缘系数 r 为 0.115 2, 均显著高于长江江豚自然种群。而且, 天鹅洲迁地保护江豚种群中具有亲缘关系的个体对达 26.14%, 高于自然种群 6 倍以上。此外, 该种群的近交系数(F_{is})为 0.046。基于亲缘系数和近交系数的分析结果均表明, 该种群存在较高的近交风险或者可能已经发生近交。本研究建议将种群中亲缘关系最多的雌性 F34 和雄性 M45 移出, 并以每代(约 5 年)按雌雄 1:1 的比例引进 2 头可繁殖个体, 以降低近亲繁殖风险。此外, 建议尽快为该迁地保护江豚种群构建遗传谱系, 以便今后开展种群遗传管理。

关键词: 长江江豚; 亲子鉴定; 亲缘关系; 近亲繁殖; 迁地保护

中图分类号: Q953 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2014)03-305-12

Inbreeding Evaluation on the *Ex Situ* Conserved Yangtze Finless Porpoise Population in Tian'ezhou National Natural Reserve

CHEN Min-Min^{①②} ZHENG Jin-Song^{①*} GONG Cheng^③

ZHAO Qing-Zhong^① WANG Ding^{①*}

① The Key Laboratory of Aquatic Biodiversity and Conservation of Chinese Academy of Sciences, Institute of Hydrobiology of Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072; ② University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049;

③ Administrative Office of Hubei Yangtze Tian'ezhou Baiji National Natural Reserve, Shishou 434400, China

Abstract: The Yangtze finless porpoise (*Neophocaena asiaeorientalis asiaeorientalis*) is a unique freshwater subspecies of *N. asiaeorientalis*, which is endemic to the Yangtze River of China and is now critically endangered. Due its natural habitat is not expected to improve in near future, *ex situ* conservation was considered as the most important strategy to prevent it from extinction. However, in theory, without effective human intervention, inbreeding is unavoidable for any *ex situ* small population. To evaluate the inbreeding level of the *ex situ* Yangtze finless porpoise population living in Tian'ezhou National Natural Reserve, and to provide useful reference information for its population genetic management, 21 polymorphic microsatellite loci were

基金项目 国家自然科学基金项目(No. 31000168), 公益性行业(农业)科研专项(No. 201203086), 湖北省自然科学基金项目(No. 2010CDB10201);

* 通讯作者, E-mail: zhengjinsong@ihb.ac.cn; wangd@ihb.ac.cn;

第一作者介绍 陈敏敏, 女, 博士研究生; 研究方向: 保护遗传学; E-mail: chenminminok@163.com。

收稿日期: 2013-10-12, **修回日期:** 2014-02-21

utilized in this study to conduct parentage identification and to analyze relatedness among individuals in this population. Maximum Likelihood method provided by Cervus V3.0 and TrioML method were used to analyze parentage and pair-wise relatedness among individuals, respectively. As a result, three whole families with certain parents and offspring, together with 1 mother-offspring and 1 father-offspring pair were detected (Table 4). Yet, it is impossible to evaluate the inbreeding level for this *ex situ* population based on such few parentages information. Nevertheless, relatedness analysis showed that the average relatedness index (r) of this population was 0.118 2, and of the candidate parent pairs it was 0.115 2. Both of them were significantly higher than those of the wild population living in the Poyang Lake (0.039 and 0.038, respectively, unpublished data). Additionally, in this *ex situ* population, 26.14% of individual pairs have some relatedness ($r > 0.187 5$, Table 5), which was 6 times higher than that in the wild population. Besides, inbreeding coefficient (F_{is}) of this population was 0.046. The results from both relatedness analysis and population inbreeding coefficient suggested that this *ex situ* population was in high risk of inbreeding or had already been suffering from inbreeding. To prevent this *ex situ* population from inbreeding or at least to mitigate the inbreeding level, on one hand, we recommend to remove the adult female F34 and male M45 from this population because they had so many possible relatives. On the other hand, we recommend to reintroduce two fertile porpoises (with an optimal sex ratio of 1:1) every generation (about 5 years) from wild population or other *ex situ* populations. Besides, we proposed to construct an accurate genetic studbook for this *ex situ* population for facilitating future population genetic management.

Key words: Yangtze finless porpoise (*Neophocaena asiaeorientalis asiaeorientalis*); Parentage identification; Relatedness; Inbreeding; *Ex situ* conservation

长江江豚 (*Neophocaena asiaeorientalis asiaeorientalis*, 以下简称“江豚”) 仅分布于长江中下游干流以及鄱阳湖和洞庭湖中。过去几十年, 由于各种人类活动的直接或者间接影响, 长江江豚自然种群的数量急剧下降, 至2012年底仅剩约1 040头, 并且呈现出加速下降趋势(2012年长江淡水豚类考察报告, 内部资料)。基于该种群所面临的严峻现状, 国际自然保护联盟(International Union for Conservation of Nature and Natural Resources, IUCN)已在物种保护红色名录中将其列为极度濒危等级(Wang et al. 2013)。鉴于长江江豚的自然栖息地环境在较短时期内不太可能发生明显好转, 迁地保护被认为是该种群得以长期存活的重要方式(Wang 2009)。长江江豚的迁地保护尝试始于20世纪90年代早期, 我国政府于1992年在湖北长江天鹅洲故道(长约21 km, 宽1~1.5 km)建立了首个国家级迁地保护自然保护区。天鹅洲保护区自1990年开始试养长江江豚, 之后经过多批次引进江豚, 至2007年底, 已形成一个30头左右、具有自我繁殖能力的迁地保护种群, 该种群平均每年有2头以上小豚出生, 标志着长江江豚的迁地保护

取得了初步成功(Wang 2009)。

迁地保护种群由于其建立者数量少, 种群在壮大过程中将不可避免地发生近亲繁殖(inbreeding)(Kalinowski et al. 1999, Frankham et al. 2002)。近亲繁殖不仅会给迁地保护种群带来诸如后代生存力下降、繁殖适合度降低以及死亡率高近交衰退(inbreeding depression)现象(Ralls et al. 1979, 1988, Groombridge et al. 2000, Ralls et al. 2002), 同时还会导致种群遗传多样性快速丢失(Frankham et al. 2002), 从而危害种群的长期发展。因此, 如何防止近亲繁殖已经成为迁地保护种群管理必须解决的重要问题。大熊猫(*Ailuropoda melanoleuca*)等陆生动物可以通过人工配对等繁殖管理措施避免或者降低近亲繁殖的发生, 然而江豚生活在水中, 人为干预极其困难, 只能通过定期的亲子鉴定和亲缘关系检测等遗传学手段来评估种群的近交水平并制定相应的种群管理措施。

Xia等(2005)曾利用其他鲸类的14个多态性微卫星标记对2002年夏季天鹅洲迁地保护江豚种群进行了亲子鉴定和亲缘关系分析, 最终鉴定出4个父-母-子家庭和3对父子关

系,从这些鉴定出的亲子关系中未发现近亲繁殖现象,并且认为候选亲本间的亲缘关系也较远。此后,2003 年 11 月和 2004 年 1 月,先后有 4 头雌性江豚被补充到保护区群体中(Wang 2009)。到本研究开展时,天鹅洲江豚种群又经历了 8 年多的发展,并且 2008 年春季发生的严重冰灾导致 5 头性成熟个体死亡,其中 2 头为妊娠母豚(周钊等 2012)。由于种群变动较大,其近亲繁殖情况有待重新评估。为此,2010 年 10 月,保护区管理处协同中国科学院水生生物研究所对该种群进行了比较全面的调查研究。借此机会,我们选用 21 个多态性微卫星标记,并结合母性遗传的线粒体 DNA(mtDNA)控制区单倍型,再次对天鹅洲迁地保护江豚种群进行亲子鉴定和亲缘关系分析,以期合理评估该种群的近亲繁殖状况并为种群遗传

管理措施的制订提供参考信息。

1 材料与方法

1.1 样品采集 为了解天鹅洲迁地保护江豚的种群动态和健康状况,经湖北省水产局批准,2010 年 10 月保护区管理处协同中国科学院水生生物研究所对该迁地保护江豚种群进行了比较全面的调查研究。本次调查沿用传统的“声驱网捕法”分批捕捉保护区中的江豚,收集体长、体重、性别等基础信息,并采集大部分个体的血液样品用于后续的血液生理指标检测和遗传分析。本次调查共捕获了 23 头江豚,但出于动物安全考虑,当年出生的 5 头幼豚仅收集基本信息而未采集血样,因此,仅有 18 头江豚的血液样品用于本研究,动物基本信息见表 1。用于遗传分析的血液样品采用一次性注射器

表 1 本研究使用的天鹅洲迁地保护江豚种群的样品信息

Table 1 Sample information of the Tian'ezhou ex situ Yangtze finless porpoises analyzed in this study

内标 ID Inner label	实验编号 Code	体长(cm) Body length	年龄 (年) Age (year)
无(死亡) No inner label (dead)	F30	128	2.7
000116604354	F31	148	12.8
000116604595	F32	101	0.2
000116604257	F33	140	7.1
000116604544	F34	149	13.7
000116604247	F35	142	8.3
000116604149	F36	140	7.1
000116604537	F37	123	1.8
000116604444	F38	156	≥16.5
000116604250	M39	166	≥13
000116604415	M40	163	12.3
000116604252	M41	158	9.8
000116604425	M42	165	≥13
000116604609	M43	136	3.4
000116604208	M44	143	4.8
000116604302	M45	145	5.4
000116604539	M46	121	1.5
000116604577	M47	126	1.9

实验编号中 F 代表雌性个体,M 代表雄性个体。
F in code represents female individuals, M represents male individuals.

从尾鳍静脉抽取, 每个体 5 ~ 10 ml, ACD (acid citrate dextrose) 试剂抗凝血, 低温运回实验室之后于 -70°C 超低温冰箱保存直至 DNA 提取。

1.2 实验方法

1.2.1 DNA 提取 采用树脂型基因组 DNA 试剂盒 (上海赛百盛基因技术有限公司) 从血液样品中抽提 DNA, 具体操作参照试剂盒说明书。提取的 DNA 溶解于 TE 缓冲液, 经琼脂糖凝胶电泳进行质量检测后置于 -20°C 冰箱中保存, 用作下游 PCR 扩增模板。

1.2.2 微卫星分型及 mtDNA 控制区扩增 本研究共选用 21 个多态性高且扩增稳定的微卫星位点 (表 2)。其中, 除了 PPH0130 来自于鼠海豚 (*Phocoena phocoena*) 之外, 其余 20 个座位均为江豚特异性位点。微卫星扩增引物由上海生工生物工程技术有限公司合成, 每条正向引物的 5' 末端采用 FAM 荧光标记, 以便于后续等位基因分型。PCR 扩增在 TC-5000 梯度热循环仪 (Bibby Scientific) 上完成, 反应体系为 $15\ \mu\text{l}$: 含 50 ~ 100 ng 基因组 DNA, $1.5\ \mu\text{l}$ $10\times$ Buffer, $0.7\ \mu\text{mol/L}$ 引物, $0.25\ \text{mmol/L}$ dNTPs 和 $0.2\ \text{U}$ *Taq* 聚合酶 (Biostar, Canada)。扩增程序为: 95°C 预变性 5 min; 95°C 变性 30 s, 59.5°C 退火 30 s, 72°C 延伸 30 s, 循环 33 次; 72°C 终末延伸 5 min。PCR 扩增产物经 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳以检测扩增效果, 之后交由上海博星基因芯片有限责任公司在 ABI3130 遗传分析仪上进行等位基因分型。每次分型每个泳道均以 ROX500 作为分子量内标, 由 GeneMapper V3.2 (Applied Biosystems) 分析软件输出分型结果, 并辅以人工核对和校正。为了减小等位基因分型误差, 每个样品每个座位至少重复扩增并分型 3 次, 然后采用计算机软件 Micro-Checker V2.2.3 (van Oosterhout et al. 2004) 检测每个位点的无效等位基因频率。

此外, 为了协助亲子关系分析, 本研究同时扩增并测定每个体的 mtDNA 控制区 5' 端高变区 597 bp 片段, 以确定不同个体的 mtDNA 单倍型。引物由上海生工生物工程技术有限公

司合成, 引物序列为 D-loop L 5'-GAA TTC CCC GGT CTT GTA AAC C-3', D-loop R 5'-GGT TTG GGC CTC TTT GAG AT-3'。PCR 扩增在 TC-5000 梯度热循环仪上完成。反应体系含 50 ~ 100 ng 基因组 DNA, 上下游引物各 $0.6\ \mu\text{mol/L}$, $2.5\ \mu\text{l}$ $10\times$ Buffer, $0.25\ \text{mmol/L}$ dNTPs 和 $1\ \text{U}$ *Taq* 聚合酶 (Biostar, Canada), 补充灭菌双蒸水至终体积 $25\ \mu\text{l}$ 。扩增程序为: 94°C 预变性 5 min; 94°C 变性 45 s, 60°C 退火 45 s, 72°C 延伸 90 s, 循环 35 次; 72°C 终末延伸 7 min。扩增产物经 1% 琼脂糖电泳检测, 然后用 PCR 产物胶回收试剂盒 (上海赛百盛基因技术有限公司) 纯化目的条带。纯化后 PCR 产物送交上海生工生物工程有限公司进行测序, 测序反应在 ABI 3730XL 测序仪 (Applied Biosystems) 上完成, 测序引物与 PCR 扩增引物相同, 全部双向测序。

1.2.3 微卫星数据分析 微卫星等位基因分型实验完成之后, 用软件 Cervus V3.0 (Marshall et al. 1998, Kalinowski et al. 2007) 计算种群的等位基因数 (number of alleles, N_a)、观察杂合度 (observed heterozygosity, H_o)、期望杂合度 (expected heterozygosity, H_e) 和多态性信息含量 (polymorphism information content, PIC) (Botstein et al. 1980, Hearne et al. 1992)。为了判断所选用的位点是否含有丰富的遗传信息用于亲子鉴定和亲缘关系分析, 采用 Cervus V3.0 计算每个位点当亲本都不清楚情况下第一亲本的非排除率 (none-exclusion probability for the first parent, N_{e-1p}) 和已知其中一个亲本, 其第二亲本的非排除率 (none-exclusion probability for the second parent, N_{e-2p}), 以及所有位点累计第一非排除率 (combined N_{e-1p}) 和累计第二非排除率 (combined N_{e-2p})。并据此计算当双亲均不清楚时, 位点累计排除率 PE II (即 $1 - N_{e-1p}$) 和当知道一个亲本时, 位点累计排除率 PE I ($1 - N_{e-2p}$)。

1.2.4 mtDNA 控制区序列分析 首先对每个体的正反向测序结果进行拼接和人工核对, 然

后用 Clustal X 软件 (Thompson et al. 1997, Jeanmougin et al. 1998) 对本研究所得到的 18 条 mtDNA 控制区序列进行比对分析, 找出变异位点并确定不同的单倍型。

1.2.5 候选亲本的设定 本研究根据张先锋 (1992) 提出的江豚体长-年龄公式计算实验对象的年龄。江豚年龄 X 与体长 $Y(\text{cm})$ 之间的计算公式为: $Y_{\delta} = 114.445 8X^{0.141 0}$ ($\delta \leq 13.0$ 龄) 和 $Y_{\phi} = 116.251 9X^{0.094 7}$ ($\phi \leq 16.5$ 龄)。

虽然不清楚江豚首次繁殖时的最小年龄, 但已有研究认为雌性江豚性成熟年龄约为 4 岁, 而雄性江豚性成熟年龄约为 4.5 岁 (张先锋 1992)。在体检过程中, 由于动物处于胁迫状态, 多数个体会强烈挣扎, 从而导致体长测量难免存在误差, 因此年龄估算也可能存在误差。为了不遗漏可能的父母本, 本研究将大于 3 岁的个体设定为候选母本或者父本, 而所有比候选父母本小 3 岁的个体设定为子代。

1.2.6 亲子鉴定 本研究用 Cervus V3.0 提供的最大似然法 (maximum likelihood method, ML) 来分析亲子关系, 这种算法基于比较最有可能的两个父本或者母本之间的 LOD 值 (似然率的自然对数值)。对于每个子代, 两个最有可能的父本或者母本的 LOD 值会产生差值, 即 Δ 值。Cervus 基于整个种群进行多次模拟来检测 Δ 值的显著性, 以判定亲子关系。本研究设置 95% 和 80% 两个显著水平, 设定模拟参数如下: 位点应用比例为 1.0; 可能的父本和母本的采样比例均设为 0.8, 因为不排除亲本漏捕或者已死亡的可能性; 潜在基因型错误率为 1%; 模拟运行 100 000 次。

1.2.7 近交系数和亲缘关系系数计算 近交系数 (breeding coefficient) 定义为近亲繁殖后代的两个等位基因来源于同一祖先的概率 (Wright 1921), 而种群的近交系数 (F_{is}) 即为所有个体近交系数的平均值。本研究用 FSTAT V2.9.3.2 (Goudet 2001) 计算天鹅洲迁地保护江豚种群的近交系数。亲缘关系 (relatedness) 即两个个体之间的遗传关系, 是指基因组成的相似度 (Michod et al. 1980), 通常用亲缘系数 r

表示。理论上, 父母子对或者同父同母子代间的亲缘系数 r 值为 0.5, 同母异父或者同父异母子代间的亲缘系数为 0.25 (Queller et al. 1989, Blouin et al. 1996)。Wang (2007) 采用 7 种不同的亲缘系数算法对经验数据和模拟数据进行估算的结果表明, TrioML (triadic maximum likelihood) 能对亲缘系数给出最准确的估算。近两年该算法被广泛应用于亲缘关系分析 (Arora et al. 2012, Simpson et al. 2013, Witzemberger et al. 2013), 因此, 本研究选用 TrioML 法 (Wang 2007) 计算个体间的亲缘系数 r 值。

2 结 果

2.1 微卫星遗传信息 本研究选用的 21 个微卫星标记从天鹅洲保护区 18 头江豚中共检测到 103 个等位基因。Micro-Checker 软件检测未发现无效等位基因 (95% 置信度)。每个位点的等位基因数 (N_a) 从 3 个到 8 个不等, 平均值为 4.9。种群平均观察杂合度 (H_o) 为 0.613 (0.278 ~ 0.875), 平均期望杂合度 (H_e) 为 0.637 (0.338 ~ 0.806); 平均多态性信息含量 (PIC) 为 0.571 (0.300 ~ 0.749)。21 个位点累计第一非排除率 (combined N_{e-1p}) 为 0.003 54, 累计第二非排除率 (combined N_{e-2p}) 为 0.000 020 9。换言之, 当双亲均不清楚时, 21 个位点的累计排除率 PE II 为 99.646%, 当知道其中一个亲本时, 21 个位点的累计排除率 PE I 为 99.998%。天鹅洲迁地保护江豚种群 21 个微卫星座位的遗传信息见表 2。

2.2 mtDNA 单倍型 本研究得到 18 个体 597 bp mtDNA 控制区高变区序列, 检测到 2 个变异位点, 最终定义 3 种线粒体单倍型 NAACR-Hap1、NAACR-Hap2 和 NAACR-Hap5 (GenBank 登录号分别为 KC135874、KC135875 和 KC135878)。控制区序列变异位点及 3 种单倍型在保护区群体中的分布情况见表 3。

2.3 亲子鉴定 本研究设定大于 3 岁的个体为候选亲本, 而比候选亲本小 3 岁以上均设定为候选子代。因此, 一共有 6 个候选母本, 7 个

表 2 天鹅洲迁地保护江豚种群 21 个微卫星位点的遗传信息
Table 2 Genetic characteristics of 21 microsatellite loci in the Tian'ezhou *ex situ* Yangtze finless porpoise population

位点 Locus	等位基因数 Number of alleles (N_a)	观察杂合度 Observed heterozygosity (H_o)	期望杂合度 Expected heterozygosity (H_e)	多态性信息含量 Polymorphism information content (PIC)	第一非排除率 None-exclusion probability for the first parent (N_{e-1p})	第二非排除率 None-exclusion probability for the second parent (N_{e-2p})	引物来源 References
SSR1	5	0.556	0.619	0.561	0.797	0.626	Zheng et al. 2008
SSR8	3	0.667	0.733	0.535	0.813	0.674	Zheng et al. 2008
SSR42	5	0.588	0.613	0.553	0.802	0.633	Zheng et al. 2008
SSR59	6	0.778	0.806	0.751	0.603	0.424	Zheng et al. 2008
SSR69	5	0.444	0.495	0.446	0.876	0.724	Zheng et al. 2008
SSR63	5	0.647	0.558	0.507	0.838	0.670	冯俊伟等 2009
SSR71	4	0.438	0.464	0.413	0.895	0.752	冯俊伟等 2009
SSR75	7	0.667	0.648	0.590	0.767	0.593	冯俊伟等 2009
SSR5	6	0.778	0.805	0.749	0.603	0.424	周钊等 2012
SSR15	3	0.556	0.681	0.588	0.781	0.633	周钊等 2012
SSR22	8	0.667	0.756	0.699	0.659	0.48	周钊等 2012
SSR40	5	0.778	0.735	0.675	0.693	0.514	周钊等 2012
SSR41	4	0.875	0.633	0.550	0.803	0.652	周钊等 2012
SSR51	4	0.556	0.519	0.458	0.868	0.721	周钊等 2012
SSR73	5	0.667	0.737	0.677	0.689	0.509	周钊等 2012
NP391	4	0.667	0.656	0.575	0.788	0.632	Chen et al. 2007
NP404	3	0.333	0.408	0.350	0.921	0.805	Chen et al. 2008
NP409	6	0.765	0.797	0.738	0.618	0.439	Chen et al. 2008
NP428	3	0.278	0.338	0.300	0.946	0.835	Chen et al. 2008
NP464	6	0.529	0.588	0.534	0.817	0.648	Chen et al. 2008
PPO130	6	0.647	0.791	0.732	0.627	0.448	Rosel et al. 1999
平均值 Mean	4.9	0.613	0.637	0.571	累计第一非排除率 Combined N_{e-1p} =0.003 54	累计第二非排除率 Combined N_{e-2p} =0.000 020 9	

表 3 天鹅洲迁地保护江豚种群的线粒体 DNA 单倍型及其分布情况

Table 3 mtDNA haplotypes and their distribution in the Tian'ezhou *ex situ* Yangtze finless porpoise population

单倍型 Haplotype	变异位点 Variable sites		个体 Individuals
	030	301	
NAACR-Hap1	C	T	M40, M44, F36
NAACR-Hap2	T	T	F30~35, F37, F38, M41~43, M45~47
NAACR-Hap5	T	C	M39

表 4 天鹅洲迁地保护江豚种群中检测出的亲子关系及亲缘系数

Table 4 Parentage identified in the Tian'ezhou *ex situ* Yangtze finless porpoise population and their relatedness

母本(年龄) Mother (age)	父本(年龄) Father (age)	子代(年龄) Offspring (age)	母子间亲缘系数 <i>r</i> relatedness index <i>r</i> of mother-offspring	父子间亲缘系数 <i>r</i> relatedness index <i>r</i> of father-offspring	亲本间亲缘系数 <i>r</i> relatedness index <i>r</i> of mother-father
F33 (7.1)	M39 (≥13)	M43 (3.4)	0.445 7	0.550 2	0.040 1
F33 (7.1)	M39 (≥13)	M46 (1.5)	0.418 8	0.500 0	0.040 1
F33 (7.1)	M41 (9.8)	F32 (0.2)	0.500 9	0.448 6	0.000 0
F34 (13.7)		M45 (5.4)	0.443 9		
	M42 (≥13)	M47 (1.9)		0.435 5	

候选父本和 16 个候选子代。通过 Cervus V3.0 软件最终检测出 3 个父-母-子家庭,以及母子对和父子对各 1 对(置信度为 95%,表 4)。所有鉴定出的母子对均共享同一种线粒体单倍型 NAACR-Hap2。从已鉴定出的亲子关系中未发现近亲繁殖情况。

2.4 种群的近交系数及个体间亲缘关系 本研究通过 FSTAT 软件计算得到天鹅洲江豚种群的近交系数 F_{is} 为 0.046。通过 TrioML 计算得到所检测出的母子对间的平均亲缘系数 r 值为 0.452 3 (0.418 8 ~ 0.500 9),父子对间的平均亲缘系数 r 值为 0.483 6 (0.435 5 ~ 0.550 2),整个种群的平均亲缘系数 r 值为 0.118 2,候选亲本间的平均亲缘系数 r 值为 0.115 2。个体间亲缘系数见表 5。Csilléry 等(2006)曾将自然种群中个体间 $r < 0.25$,即亲缘关系小于同母异父或者同父异母的个体对归结为无亲缘关系个体对。但在实际种群中,基于微卫星计算得到的 r 值通常会在理论值上下浮动。因

此,本研究根据 Blouin 等(1996)的建议采用亲缘关系系数的均值作为区分各级亲缘关系的标准,将二级亲缘关系($r = 0.25$)和三级亲缘关系($r = 0.125$)的均值 $r = 0.187 5$ 作为区分二级亲缘关系和无亲缘关系的阈值。结果显示天鹅洲江豚种群中存在亲缘关系的个体对占 26.14%。

3 讨 论

在使用微卫星标记进行亲子鉴定时,累计排除率受各位点排除率、位点数量以及样品总数的影响。研究表明,位点的等位基因越多,位点的排除率越高;使用的位点数越多,总排除率越高;样本数越多,总排除率越高(Nesje et al. 2000, Isberg et al. 2004, Itoh et al. 2012)。Isberg 等(2004)在对湾鳄(*Crocodylus porosus*)进行亲子鉴定时,所使用的 14 个微卫星位点的 PE I 为 99.88%,PE II 为 97.42%。Haanes 等(2005)在对挪威马鹿(*Cervus elaphus*

表 5 天鹅洲迁地保护江豚种群个体间亲缘关系系数

Table 5 Relatedness among individuals in the Tian'ezhou ex situ Yangtze finless porpoise population

	F30	F31	F32	F33	F34	F35	F36	F37	F38	M39	M40	M41	M42	M43	M44	M45	M46
F31	0.056 1																
F32	0.018 4	0.109 1															
F33	0.155 0	0.169 9	0.500 9														
F34	0.295 4	0.214 1	0.034 1	0.157 0													
F35	0.330 5	0.348 0	0.048 7	0.227 1	0.166 7												
F36	0.000 0	0.197 8	0.022 7	0.041 8	0.226 1	0.144 9											
F37	0.110 9	0.049 0	0.216 1	0.000 0	0.022 1	0.029 6	0.037 5										
F38	0.059 9	0.042 5	0.186 3	0.000 0	0.104 8	0.208 5	0.027 2	0.472 3									
M39	0.000 0	0.143 5	0.029 7	0.040 1	0.075 5	0.077 0	0.000 0	0.000 0	0.024 2								
M40	0.228 0	0.092 8	0.051 2	0.095 3	0.187 6	0.050 7	0.044 8	0.120 3	0.011 9	0.057 1							
M41	0.038 4	0.062 0	0.448 6	0.000 0	0.024 7	0.000 0	0.000 0	0.370 0	0.353 0	0.000 0	0.075 1						
M42	0.097 7	0.168 9	0.070 1	0.041 1	0.202 7	0.155 8	0.000 0	0.110 9	0.165 5	0.000 0	0.296 8	0.058 4					
M43	0.028 7	0.193 1	0.196 7	0.445 7	0.049 3	0.038 3	0.030 0	0.027 8	0.061 6	0.550 2	0.092 2	0.000 0	0.043 2				
M44	0.000 0	0.115 2	0.047 0	0.235 2	0.243 5	0.037 6	0.082 9	0.001 7	0.000 0	0.210 6	0.185 7	0.000 0	0.007 8	0.053 3			
M45	0.243 2	0.071 4	0.004 1	0.322 8	0.443 9	0.237 0	0.023 4	0.051 2	0.026 4	0.000 0	0.210 3	0.010 4	0.229 8	0.000 0	0.124 3		
M46	0.013 7	0.104 6	0.351 7	0.418 8	0.000 0	0.052 3	0.016 1	0.025 0	0.039 7	0.500 0	0.132 4	0.000 0	0.039 1	0.454 0	0.111 1	0.000 0	
M47	0.066 2	0.060 9	0.082 9	0.025 1	0.303 1	0.066 5	0.328 3	0.039 7	0.023 5	0.081 8	0.435 5	0.121 1	0.435 5	0.024 3	0.125 5	0.235 7	0.066 6

表中粗体数字表示与之相对应的两个个体具有亲缘关系($r > 0.1875$)。
Bold decimals in the table indicate that the corresponding individual pairs have some relatedness ($r > 0.1875$).

atalanticus) 进行遗传分析时选用了 19 个微卫星位点, PE I 为 99.98%, PE II 为 98.79%。Itoh 等 (2012) 通过亲缘关系分析研究棕熊 (*Ursus arctos*) 的扩散规律时选用了 21 个微卫星位点, 其 PE I 为 99.99%, PE II 为 99.58%。已有研究表明, 当 PE I 与 PE II 分别大于 99.9% 与 99% 时, 亲子鉴定的结果基本可信。本研究采用 21 个微卫星位点对天鹅洲 2010 年 10 月江豚种群进行亲子关系分析, 得到的 PE I 和 PE II 分别达到 99.998% 和 99.646%。因此, 本研究选用的 21 个微卫星位点已含有足够的遗传信息用于亲子关系分析, 由此得到的亲子鉴定结果可信度高。然而, 本研究从天鹅洲种群 18 个体中仅检测出 3 个父-母-子家庭 (其中两头小豚为同父同母), 以及母子对和父子对各 1 对, 检测出的亲子关系较少。我们推测, 主要原因可能与不完全采样以及此前某些年份部分个体损失有关。首先, 在 2010 年 10 月天鹅洲捕豚调查活动中, 出于动物的安全考虑, 当年出生的 5 头小豚没有采集血液样品用于遗传分析, 因此这 5 头小豚的父母本无法确定, 从而导致该种群中的 5 个父-母-子家庭无法被检测到。其次, 2008 年早春, 天鹅洲保护区曾发生过 1 次严重冰灾, 导致 5 头成年江豚先后死亡 (周钊等 2012), 因此本研究中某些个体的亲本或者子代可能已经在这次冰灾中死亡。此外, 在捕豚操作过程中也不排除部分个体漏捕的可能性, 而这些逃脱的个体往往是具有较强活动能力的成年江豚, 有可能造成候选亲本的不完全采样, 从而给亲子关系检测造成一定的影响。

从本研究检测出的亲子关系可以看出, 成年雌豚 F33 拥有 3 个后代 (M43、M46 和 F32) (表 4), 说明 F33 在该种群中繁殖非常活跃。其中后代 M43 与 M46 的年龄差为 1.9, M46 与 F32 的年龄差为 1.3, M43 与 F32 的年龄差为 3.2, 这意味着除去妊娠第 1 个子豚 (M43) 的时间, 雌豚 F33 在约 3.2 年时间内先后生育了 3 个后代, 最短生殖周期为 1.3 年。这与 Xia 等 (2005) 研究认为长江江豚的繁殖周期可能

小于 1 年半相符。本研究鉴定出的亲本对 F33 与 M39 以及 F33 与 M41 之间的亲缘关系系数 r 分别为 0.040 1 和 0.000 0, 表明它们之间亲缘关系较远。然而, 由于本研究检测出的亲子关系较少, 尚无法根据已鉴定出的亲子关系来判断该种群是否存在近亲繁殖。已有研究表明, 遗传谱系的构建是对迁地保护和人工圈养种群进行遗传管理从而避免或尽可能减缓近亲繁殖的有效手段 (蒋志刚等 2006, 孙小雅等 2010)。因此, 建议今后每隔 5 年左右对天鹅洲江豚种群进行调查采样和遗传分析, 以便为该种群构建完整准确的遗传谱系并了解该种群的动态变化, 从而为今后的种群遗传管理奠定基础。

理论上, 父母子对或者同父同母子代间的亲缘关系系数 r 值为 0.5 (Queller et al. 1989, Blouin et al. 1996)。本研究从天鹅洲江豚种群中检测到母子对间的亲缘系数 r 值平均为 0.452 3 (0.418 8 ~ 0.500 9), 父子对间的平均亲缘系数为 0.483 6 (0.435 5 ~ 0.550 2), 同父同母后代 (M46 和 M43) 之间的亲缘系数为 0.454 0, 均非常接近理论值 0.5, 从而表明本研究选用的 21 个微卫星位点能够为亲缘关系分析提供充分的遗传信息, 并且计算得到的亲缘系数也基本准确。进一步的分析表明, 天鹅洲江豚种群 18 个体中的 8 个 (F32、F33、F34、F35、M40、M43、M45 和 M47) 存在 5 个以上亲缘个体 (表 5)。其中候选亲本 F34 和 M45 存在的亲缘个体最多, 它们不仅与将近一半的候选亲本 (F34 与 F31、F36、M40、M42、M44 和 M45; M45 与 F33、F34、F35、M40 和 M42) 存在亲缘关系, 还与在未来两年将达到性成熟的 F30 和 M47 也存在亲缘关系。经计算, 天鹅洲江豚种群中具有亲缘关系的个体对比比例高达 26.14%, 超出鄱阳湖江豚自然种群 (3.97%) 6 倍以上 (陈敏敏等, 未发表数据)。而理论上, 正常自然种群中具有亲缘关系的个体对比比例通常少于 10% (Csilléry et al. 2006)。此外, 天鹅洲江豚种群的平均亲缘系数为 0.118 2, 候选亲本间的平均亲缘系数为 0.115 2, 均显著高于鄱阳湖江豚自然种群 (平均亲缘系数和候选亲本

间平均亲缘系数分别为 0.039 和 0.038) (陈敏敏等, 未发表数据)。而未发生近亲繁殖的自然种群的平均亲缘系数和候选亲本间平均亲缘系数通常接近为 0。如, 棕熊候选亲本间平均亲缘系数 r 为 -0.014 (Itoh et al. 2012), 美国黑熊 (*U. americanus*) 群体平均亲缘关系 r 为 0.038, 候选亲本间平均亲缘系数 r 为 0.056 (Onorato et al. 2004)。此外, 本研究计算得到天鹅洲江豚种群的近交系数 F_{is} 为 0.046, 甚至高于成都大熊猫繁育基地圈养的大熊猫繁殖群体 ($n=37$, $F_{is}=0.045$) (孙小雅等 2010)。因此, 本研究基于亲缘关系系数以及近交系数的分析结果均表明, 天鹅洲江豚种群存在较高的近交风险或者可能已经发生一定程度的近交。可以预计, 随着后代中具有亲缘关系的个体不断增加, 该种群发生近亲繁殖的概率也会不断增加。长江江豚自然种群的生存状况越来越严峻, 迁地保护被认为是避免该种群灭绝最有希望的保护措施 (Wang 2009)。而天鹅洲江豚种群是目前最为成功的迁地保护江豚种群, 因此, 必须对其采取一些积极有效的预防措施, 以保证其长远健康发展。

一般而言, 迁地保护种群的发展可分为 3 个阶段: 即人工原种群建立阶段, 种群增长阶段和种群维持阶段 (Frankham et al. 2002)。天鹅洲迁地保护江豚种群平均每年都有 2 头以上小豚出生 (Wang 2009), 而且 2010 年 10 月捕豚调查结果显示被捕获的 6 头性成熟雌性中有 2 头妊娠并哺乳、2 头妊娠和 2 头哺乳, 表明该种群正处于快速增长阶段。该阶段管理的重点是尽量避免近亲繁殖 (Frankham et al. 2002)。然而, 本研究通过个体间亲缘关系系数以及种群的近交系数分析, 发现该迁地保护江豚种群存在较高的近交风险或者可能已经发生一定程度的近交, 因而必须采取措施对其种群结构进行调整。基于亲缘关系分析结果, 为了降低近亲繁殖的概率, 本研究建议将天鹅洲江豚种群中亲缘关系最多的雌性 F34 和雄性 M45 从目前种群中迁出。理论上, 如果不采取人为干预措施, 任何封闭的小种群最终都会近亲繁殖

(Frankham et al. 2002)。通常建议除了需要将亲缘关系较多的繁殖个体迁出群体之外, 还应从自然种群或者其他迁地保护群体中引进新的繁殖个体, 以降低近交风险。Frankham 等 (2002) 研究认为, 每代引进 1 个具有繁殖能力的新个体就能在很大程度上缓解近交和繁殖适合度降低等问题, 但对于现实种群, 一般需要多于 1 个个体。由于天鹅洲迁地保护江豚种群较小, 并且之前对 2008 年春季种群的计算机模拟结果表明, 该种群的遗传多样性将快速下降, 需要从自然种群引进一定数量的、代表不同遗传变异的野生个体, 尤其是具有繁殖潜力的雌性个体 (周钊等 2012)。为了降低近亲繁殖的风险并避免近交导致种群遗传多样性的加速下降, 本研究建议每代 (约 5 年) 按雌雄 1:1 的比例向天鹅洲引进 2 头可繁殖个体。一方面, 可以采取周钊等 (2012) 的建议, 将具有相对较丰富遗传多样性的鄱阳湖江豚种群作为理想的个体补充来源。另一方面, 由于铜陵保护区和武汉白暨豚馆人工豢养繁殖江豚群体同样存在较高的近亲繁殖风险 (冯俊伟等 2009), 因此, 另外一种合理的解决问题的办法是在建立完善的遗传谱系之后通过不同的迁地保护江豚种群/人工豢养群体间定期进行个体交换等种群遗传管理措施来降低近亲繁殖的风险。

致谢 感谢天鹅洲国家级自然保护区工作人员以及中国科学院水生生物研究所鲸类保护生物学学科组的同事们在样品采集过程中提供的帮助。

参 考 文 献

- Arora N, van Noordwijk M A, Ackermann C, et al. 2012. Parentage-based pedigree reconstruction reveals female matrilineal clusters and male-biased dispersal in nongregarious Asian great apes, the Bornean orang-utans (*Pongo pygmaeus*). *Molecular Ecology*, 21(13): 3352–3362.
- Blouin M S, Parsons M, Lacaille V, et al. 1996. Use of microsatellite loci to classify individuals by relatedness. *Molecular Ecology*, 5(3): 393–401.
- Botstein D, White R L, Skolnick M, et al. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, 32

- (3): 314 – 331.
- Chen L, Bruford M W, Yang G. 2007. Isolation and characterization of microsatellite loci in the finless porpoise (*Neophocaena phocaenoides*). *Molecular Ecology Notes*, 7 (6): 1129 – 1131.
- Chen L, Yang G. 2008. Development of tetranucleotide microsatellite loci for the finless porpoise (*Neophocaena phocaenoides*). *Conservation Genetics*, 9(4): 1033 – 1035.
- Csilléry K, Johnson T, Beraldi D, et al. 2006. Performance of marker-based relatedness estimators in natural populations of outbred vertebrates. *Genetics*, 173(4): 2091 – 2101.
- Frankham R, Ballou J D, Briscoe D A. 2002. *Introduction to Conservation Genetics*. 2th ed. UK: Cambridge University Press.
- Goudet J. 2001. FSTAT 2.9.3.2, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices. [CP/OL]. [2013-02-05]. <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>.
- Groombridge J J, Jones C G, Bruford M W, et al. 2000. Conservation biology: ‘Ghost’ alleles of the Mauritius kestrel. *Nature*, 403: 616.
- Haanes H, Rosef O, Veiberg V, et al. 2005. Microsatellites with variation and heredity applicable to genetic studies of Norwegian red deer (*Cervus elaphus atlanticus*). *Animal Genetics*, 36(5): 454 – 455.
- Hearne C M, Ghosh S, Todd J A. 1992. Microsatellites for linkage analysis of genetic traits. *Trends in Ecology and Evolution*, 8(8): 288 – 294.
- Isberg S R, Chen Y, Barker S G, et al. 2004. Analysis of microsatellites and parentage testing in saltwater crocodiles. *Journal of Heredity*, 95(5): 445 – 449.
- Itoh T, Sato Y, Kobayashi K, et al. 2012. Effective dispersal of brown bears (*Ursus arctos*) in eastern Hokkaido, inferred from analyses of mitochondrial DNA and microsatellites. *Mammal Study*, 37(1): 29 – 41.
- Jeanmougin F, Thompson J D, Gouy M, et al. 1998. Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends in Biochemical Sciences*, 23(10): 403 – 405.
- Kalinowski S T, Hedrick P W, Miller P S. 1999. Inbreeding depression in the Speke’s gazelle captive breeding program. *Conservation Biology*, 14(5): 1375 – 13845.
- 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.
- Marshall T C, Slate J, Kruuk L E B. et al. 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology*, 7(5): 639 – 655.
- Michod R E, Hamilton W D. 1980. Coefficients of relatedness in sociobiology. *Nature*, 288(5792): 694 – 697.
- Nesje M, Røed K H, Lifjeld J T, et al. 2000. Genetic relationships in the peregrine falcon (*Falco peregrinus*) analysed by microsatellite DNA markers. *Molecular Ecology*, 9(1): 53 – 60.
- Onorato D P, Hellgren E C, van Den Bussche R A, et al. 2004. Paternity and relatedness of American black bears recolonizing a desert montane island. *Canadian Journal of Zoology*, 82 (8): 1201 – 1210.
- Queller D C, Goodnight K F. 1989. Estimating relatedness using genetic markers. *Evolution*, 42(2): 258 – 275.
- Ralls K, Ballou J D. 2002. Conservation concerns with inbreeding // Frankham R, Ballou J D, Briscoe D A, et al. *Introduction to Conservation Genetics*. UK: Cambridge University Press, 256 – 257.
- Ralls K, Ballou J D, Templeton A. 1988. Estimates of lethal equivalents and the cost of inbreeding in mammals. *Conservation Biology*, 2(2): 185 – 193.
- Ralls K, Brugger K, Ballou J. 1979. Inbreeding and juvenile mortality in small populations of ungulates. *Science*, 206 (4422): 1101 – 1103.
- Rosel P E, France S C, Wang J Y, et al. 1999. Genetic structure of harbour porpoise *Phocoena phocoena* populations in the northwest Atlantic based on mitochondrial and nuclear markers. *Molecular Ecology*, 8(suppl 1): S41 – S54.
- Simpson S, Blampied N, Peniche G, et al. 2013. Genetic structure of introduced populations: 120-year-old DNA footprint of historic introduction in an insular small mammal population. *Ecology and Evolution*, 3(3): 614 – 628.
- Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, et al. 1997. The CLUSTAL _ X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 25(24): 4876 – 4882.
- 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.
- Wang D. 2009. Population status, threats and conservation of the Yangtze finless porpoise. *Chinese Science Bulletin*, 54(19): 3473 – 3484.
- Wang D, Turvey S T, Zhao X, et al. 2013. *Neophocaena asiaeorientalis* ssp. *asiaeorientalis* // IUCN. 2013. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2013. 1. [BD/OL]. [2013-07-16]. <http://www.iucnredlist.org>.
- Wang J L. 2007. Triadic IBD coefficients and applications to estimating pairwise relatedness. *Genetical Research*, 89(3):

135 – 153.

Witzenberger K A, Hochkirch A. 2013. Evaluating *ex situ* conservation projects: genetic structure of the captive population of the Arabian sand cat. *Mammalian Biology*, 78 (5): 379 – 382.

Wright S. 1921. Systems of mating. II. The effects of inbreeding on the genetic composition of a population. *Genetics*, 6(2): 124 – 143.

Xia J H, Zheng J S, Xu L M, et al. 2005. Parentage determination of an isolated Yangtze finless porpoise population *Neophocaena phocaenoides asiaorientalis* in the Yangtze Tian-e-Zhou Baiji National Natural Reserve based on molecular data. *Progress in Natural Science*, 15(2): 149 – 156.

Zheng J S, Liao X L, Tong J G, et al. 2008. Development and characterization of polymorphic microsatellite loci in the endangered Yangtze finless porpoise (*Neophocaena phocaenoides asiaorientalis*). *Conservation Genetics*, 9(4): 1007 – 1009.

冯俊伟, 郑劲松, 周钊, 等. 2009. 微卫星分型法应用与于豢养繁殖长江江豚的父权鉴定. *现代生物医学进展*, 9 (21): 4015 – 4020.

蒋志刚, 李春旺, 曾岩. 2006. 麋鹿的婚配偶制度、交配计策与有效种群. *生态学报*, 26(7): 2255 – 2260.

孙小雅, 张志和, 张文平, 等. 2010. 圈养大熊猫群体间的基因流状况分析. *四川动物*, 29(3): 333 – 339.

张先锋. 1992. 江豚的年龄鉴定、生长和生殖的研究. *水生生物学报*, 16(4): 289 – 298.

周钊, 郑劲松, 陈敏敏, 等. 2012. 天鹅洲迁地保护江豚群体的遗传评估与发展预测. *水生生物学报*, 36(3): 403 – 411.

《动物学杂志》第十一届编辑委员会

名誉主编：马 勇

主 编：宋延龄

副 主 编：赵 勇 彭景榧 孙悦华 梁 冰(常务)

编 委：(以姓氏笔画为序)

丁长青 马 勇 马志军 马建章 王德华 计 翔 石树群 孙青原 孙悦华

刘迺发 许木启 李 明 李保国 李枢强 李新正 张正旺 张春光 张明海

张树义 张海燕 宋延龄 宋林生 宋昭彬 杨增明 宛新荣 郑光美 赵 勇

费 梁 钟文勤 桂建芳 夏国良 徐存拴 徐宏发 徐延恭 梁 冰 彭贤锦

彭景榧 蒋志刚 戴家银 魏辅文

编 辑：梁 冰 尹 航