

用 mtDNA 序列鉴定出上海海域 须鲸科物种大村鲸

赵志鹏^① 向余劲攻^{①②} 何鑫^③ 宋晨薇^① 单鵬^③ 刘文亮^{①②*}

① 华东师范大学生态与环境科学学院, 上海市城市化生态过程与生态恢复重点实验室, 长江口湿地生态系统野外监测研究站 上海 200241; ② 崇明生态研究院 上海 200062; ③ 上海科技馆分馆上海自然博物馆自然史研究中心 上海 200041

摘要: 测定了采自上海海域的一头死亡须鲸骨骼样本的线粒体 DNA (mtDNA) 细胞色素 *b* 基因 (Cyt *b*) 序列 330 bp (登录号 MK295815)、细胞色素 C 氧化酶 I 基因 (CO I) 序列 206 bp (登录号 MK317953) 和控制区 (control region) 序列 231 bp (登录号 MK317954)。通过 GenBank 中的 BLAST 分析, 结果表明, 样本的上述三部分序列与大村鲸 (*Balaenoptera omurai*) 对应序列的相似性均达到 100%, 基于最大似然法 (ML) 法构建的系统发育树与 BLAST 结果一致, 故将标本鉴定为大村鲸, 为上海海域首次记录。

关键词: 大村鲸; 线粒体 DNA; 鉴定; 上海海域

中图分类号: Q959 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2019) 04-493-08

Identification of *Balaenoptera omurai* (Balaenopteridae) from Shanghai Seas by Using mtDNA Gene Sequences

ZHAO Zhi-Peng^① XIANGYU Jing-Gong^{①②} HE Xin^③
SONG Chen-Wei^① SHAN Kun^③ LIU Wen-Liang^{①②*}

① Yangtze River Delta Estuary Wetland Station, Shanghai Key Lab for Urban Ecological Processes and Eco-Restoration, School of Ecological and Environmental Science, East China Normal University, Shanghai 200241;

② Institute of Eco-Chongming, Shanghai 200062; ③ Natural History Research Center, Shanghai Natural History Museum, Branch of Shanghai Science & Technology Museum, Shanghai 200041, China

Abstract: The portions of the mitochondrial DNA (mtDNA) Cyt *b* gene (330 bp, GenBank accession: MK295815), cytochrome c oxidase subunit I (CO I) (206 bp, GenBank accession: MK317953) and mitochondrial DNA (mtDNA) control region (231 bp, GenBank accession: MK317954) of the skeleton sample from a dead baleen whale collected at the Shanghai seas were sequenced. The blasting result in GenBank shows that the three sequences have maximal similarity at 100% with those of *Balaenoptera omurai*

基金项目 国家重点研发计划项目 (No. 2017YFC0506003), 华东师范大学科研创新基金科技基础性工作项目;

* 通讯作者, E-mail: wlliu@sklec.ecnu.edu.cn;

第一作者介绍 赵志鹏, 男, 硕士研究生; 研究方向: 生物多样性与系统演化; E-mail: 1051573199@qq.com。

收稿日期: 2019-01-10, 修回日期: 2019-05-13 DOI: 10.13859/j.cjz.201904006

(Table 1 - 3); and the phylogenetic trees based on maximum likelihood are consistent with the blasting result (Fig. 5 - 7). The result shows that the sample should be identified as *B. omurai*, and it is recorded for the first time from Shanghai Seas.

Key words: *Balaenoptera omurai*; mtDNA; Identification; Shanghai Seas

2018年4月16日,上海吴淞口海域(31°24'37" N, 121°30'08" E)发现一头死亡鲸的残骸,随后运至宝山区宝杨码头进行处理。经测量,残余尸体全长6.5 m,但由于该鲸尸体高度腐烂,且包括头部在内的身体前半部已经大量缺失,鳍肢缺损,无法通过形态进行物种鉴定(图1)。



图1 死亡鲸照片

Fig. 1 Photograph of the dead whale

鲸类可以通过体型、鳍、鲸须、腹褶等外观特征进行快速鉴定。基于 mtDNA 的分子鉴定技术广泛应用于鲸类残骸和残缺标本的鉴定中。Baker 等(1994, 1996, 2000)通过线粒体 DNA 控制区序列鉴定分析了日本、韩国市场上鲸类肉制品的种类和来源; Dalebout 等(1998)通过控制区序列对南半球的喙鲸科(Ziphiidae)物种进行了鉴定;朱小静等(2018)通过控制区序列鉴定出长须鲸(*Balaenoptera physalus*)。本实验从鲸骨中提取基因组 DNA,通过对线粒体 DNA Cyt *b* 基因、CO I 基因和控制区的部分序列进行 PCR 扩增、测序,再通过与 GenBank 中的同源序列进行比对,并构建系统发育树进行分析,将所采样本鉴定为大村鲸(*B. omurai*),为上海海域首次发现此物种。

1 材料与方法

1.1 基因组提取及目的基因扩增测序

材料来源于该鲸脊椎骨(图2)。鲸骨经紫外线照射2 h后用灭菌钻头钻取深层骨粉,使用0.5 mol/L的EDTA浸泡12 h,每6 h离心一次,更换EDTA。采用海洋动物组织基因组DNA提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司]提取基因组DNA,延长蛋白酶K消化时间为12 h。

本实验目标基因序列 Cyt *b* 所用引物为 L14724 和 H15149 (Kocher et al. 1989)。CO I 基因序列所用引物为 5'-GCA GGC ACA GGC TGA ACT GT-3'和 5'-ACT AGG ACT GAT CAT ACG AA-3'。控制区序列所用引物为 5'-ACC ATC AGC ACC CAA AGC TG-3'和 5'-ACG GGC TTT AAC TTA CCG TA-3'。引物均由上海生工生物工程技术公司合成。

PCR 扩增体系为 20 μ l: 10 \times EX *Taq* Buffer (Mg²⁺ plus) 10 μ l, dNTP Mixture (2.5 mmol/L) 8 μ l, 正反引物 (0.5 μ mol/L) 各 4 μ l, EX *Taq* DNA 聚合酶 (5 U/ μ l) 0.5 μ l, DNA 模板 4 μ l, ddH₂O 69.5 μ l, 共 100 μ l。混匀后分为 5 等份,设 5 个温度梯度。PCR 反应参数,94 $^{\circ}$ C 变性 60 s,退火温度为 47 $^{\circ}$ C、49 $^{\circ}$ C、51 $^{\circ}$ C、53 $^{\circ}$ C、55 $^{\circ}$ C, Cyt *b* 基因退火时间为 30 s, CO I 基因和控制区的退火时间为 20 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共循环 38 次,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。PCR 产物利用 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测。PCR 产物由上海华大基因医学检验有限公司测序(测序仪器为 ABI3730XL, 测序试剂为 BDT v3.1)。

1.2 序列对比及系统发育分析

测序结果使用 DNASTart 软件中的 SeqMan

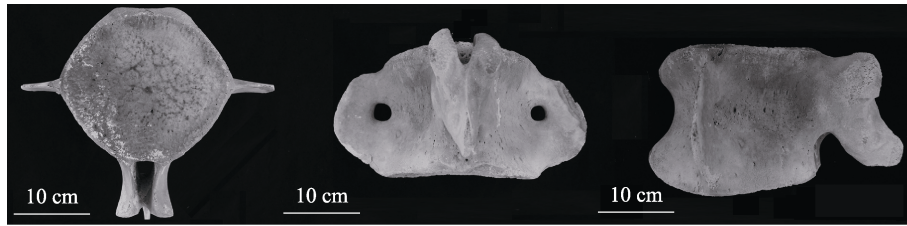


图 2 鲸椎骨照片

Fig. 2 Photograph of the whale vertebra

程序拼接、核对; 使用 Bioedit 程序整合序列, 进行修正后提交至 GenBank 中进行 BLAST 分析, 获取相似的同源序列。构建系统发育树的样本和相似物种的同源序列则使用 jModeltest 2.1.7 (Darriba et al. 2012) 计算最优模型, 基于最大似然法 (maximum likelihood, ML) 使用 MEGA7.0 构建系统发育树 (Kuma et al. 2016)。

2 结果

2.1 基因组 DNA 提取及 PCR 扩增

使用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测基因组 DNA, 胶图显示有拖尾条带 (图 3)。使用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 有清晰条带 (图 4)。

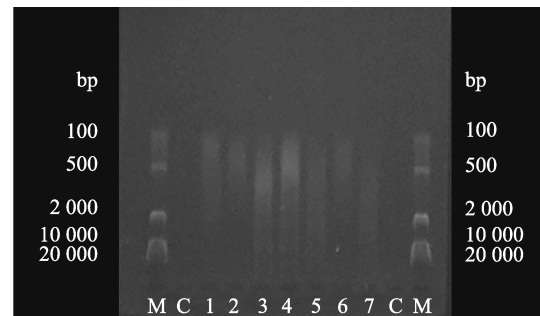


图 3 鲸骨全基因组 DNA 琼脂糖凝胶电泳检测结果

Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of genomic DNA of the whale bone

1 ~ 7. 基因组 DNA; C. 阴性对照; M. λ -Hind III D20000 DNA 分子量标准 (TIANGEN 公司, 北京)。

1 - 7. DNA extraction; C. Negative control; M. λ -Hind III D20000 digest marker (TIANKEN Company, Beijing).

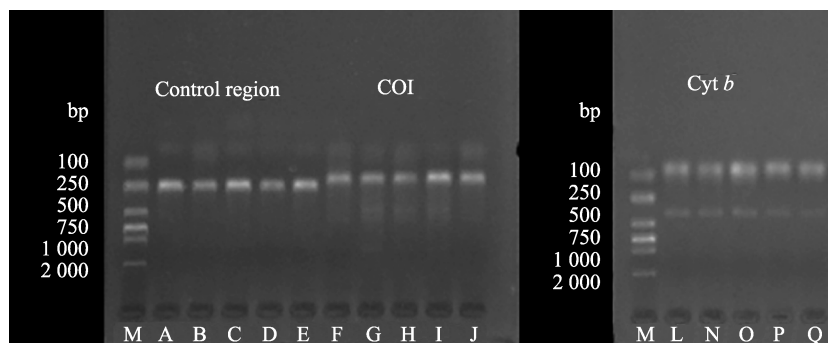


图 4 鲸骨 DNA 的 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳结果

Fig. 4 Agarose gel electrophoresis of PCR products of whale bone genomic DNA

A ~ E. 以鲸骨基因组 DNA 为模版扩增的控制区序列; F ~ J. 以鲸骨基因组 DNA 为模版扩增的 CO I 序列; L ~ Q. 以鲸骨基因组 DNA 为模版扩增的 Cyt b 序列; M. D2000 DNA 分子量标准 (TIANGEN 公司, 北京)。

A - E. Control region from the whale bone; F - J. CO I from the whale bone; L - Q. Cyt b from the whale bone; M. D2000 DNA marker (TIANKEN Company, Beijing).

2.2 序列分析

样本 *Cyt b* 基因的双向测序, 得到有效序列长度为 330 bp (登录号 MK295815)。序列的碱基组成为, A 29.39%, G 15.15%, C 29.09%, T 26.36%。筛选整理 BLAST 结果 (表 1), 显示其与大村鲸以及凭证标本号为 NJNU0379 和 S1 的鳀鲸 (*B. edeni*) 序列相似度达 100%, 与塞鲸 (*B. borealis*) 序列的相似度为 97%, 与南极小须鲸 (*B. bonaerensis*)、鳀鲸、小鳀鲸 (*B. acutorostrata*)、长须鲸、布氏鲸 (*B. brydei*) 序列的相似度为 94%。

样本 CO I 基因的双向测序, 得到有效序列长度为 206 bp (登录号 MK317953)。序列的碱基组成为 A 27.18%, G 15.53%, C 30.58%, T 26.70%。筛选整理 BLAST 结果 (表 2), 其与登录号为 AB201257 的大村鲸序列相似度达 100%, 与其他大村鲸序列相似度达 99%, 仅在第 74 位点处存在碱基 C 到 T 的转换, 与蓝鲸 (*B. musculus*)、小鳀鲸序列的相似度为 94%, 与大翅鲸 (*Megaptera novaeangliae*)、塞鲸、

长须鲸、鳀鲸、南极小须鲸序列的相似度为 93%。

样本控制区的双向测序, 得到有效序列长度为 231 bp (登录号 MK317954)。序列的碱基组成为 A 31.60%, G 12.12%, C 20.78%, T 35.50%。筛选整理 BLAST 结果 (表 3), 显示其与登录号为 AB116096 的大村鲸序列相似度达 99%, 在第 191 位点处存在碱基 C 到 T 的转换, 与其他大村鲸序列以及凭证标本号为 NJNU0379 和 S1 的鳀鲸序列相似度达 100%, 与鳀鲸序列相似度为 82%, 与塞鲸序列相似度为 81%, 与布氏鲸和南极小须鲸序列相似度为 80%。

2.3 系统发育分析结果

样本 *Cyt b*、CO I 和控制区序列与须鲸科及外群物种序列分别基于 GTR + I + G 模型、TrN + G 模型和 HKY + I 模型, 使用最大似然法构建系统发育树 (图 5 ~ 7)。在 *Cyt b*、CO I 和控制区 3 种基因序列的系统发育树中, 样本序列均与大村鲸序列形成单系, 支持率分别

表 1 样本 *Cyt b* 基因序列与近似物种同源序列的比对结果

Table 1 Comparison between *Cyt b* sequence of the sample and homologous sequence of the approximate species

物种 Species	登陆号 Accession	凭证标本 Vouchers	BLAST 结果 Result of BLAST (%)	差异总数 Sum of divergence (bp)
大村鲸 <i>Balaenoptera omurai</i>	KP230447	PT2011112901	100	0
大村鲸 <i>B. omurai</i>	KM233837	MauBs_2013_11_03	100	0
大村鲸 <i>B. omurai</i>	EF103940	—	100	0
大村鲸 <i>B. omurai</i>	AB201257	NSMT-32992	100	0
大村鲸 <i>B. omurai</i>	AB201256	NSMT-32505	100	0
大村鲸 <i>B. omurai</i>	KX254409	BRA_2010_09_10	100	0
鳀鲸 <i>B. edeni</i>	AF398371	NJNU0379	100	0
鳀鲸 <i>B. edeni</i>	AF146392	S1	100	0
塞鲸 <i>B. borealis</i>	HM034302	LA09.002	97	11
南极小须鲸 <i>B. bonaerensis</i>	KU215791	SEFSC:MMMGL:26Bbon001	94	19
鳀鲸 <i>B. edeni</i>	KJ586849	SEFSC:MMMGL:Bede007	94	19
小鳀鲸 <i>B. acutorostrata</i>	AJ226130	probe I4	94	20
长须鲸 <i>B. physalus</i>	KC572815	76735	94	21
布氏鲸 <i>B. brydei</i>	AB201259	NSMT-33072	94	21

差异总数包括转换、颠换、插入和缺失; “—” 表示未获得相关信息。

Sum of divergence including transitions, transversions, insertions and deletions; “—” No relevant information.

表 2 样本 CO I 因序列与近似物种同源序列的比对结果

Table 2 Comparison between CO I sequence of the sample and homologous sequence of the approximate species

物种 Species	登陆号 Accession	凭证标本 Vouchers	BLAST 结果 Result of BLAST (%)	差异总数 Sum of divergence (bp)
大村鲸 <i>Balaenoptera omurai</i>	AB201257	NSMT-32992	100	0
大村鲸 <i>B. omurai</i>	KP993089	BO1	99	1
大村鲸 <i>B. omurai</i>	KX254410	BRA_2010_09_10	99	1
大村鲸 <i>B. omurai</i>	KP230448	PT2011112901	99	1
大村鲸 <i>B. omurai</i>	KM233839	MauBs_2013_11_03	99	1
大村鲸 <i>B. omurai</i>	AB201256	NSMT-32505	99	1
蓝鲸 <i>B. musculus</i>	MF409242	——	94	13
小须鲸 <i>B. acutorostrata</i>	AJ554054	——	94	13
大翅鲸 <i>Megaptera novaeangliae</i>	EU496287	SEFSC:MMGL:Mnov005	93	14
塞鲸 <i>B. borealis</i>	MF409249	E91	93	15
长须鲸 <i>B. physalus</i>	KF281609	Bp150807	93	15
鲸鲸 <i>B. edeni</i>	JN190946	Whale-99-Kollam	93	15
南极小须鲸 <i>B. bonaerensis</i>	AP006466	——	93	15

差异总数包括转换、颠换、插入和缺失; “——” 表示未获得相关信息。

Sum of divergence including transitions, transversions, insertions and deletions; “——” No relevant information.

表 3 样本控制区序列与近似物种同源序列的比对结果

Table 3 Comparison between control region sequence of the sample and homologous sequence of the approximate species

物种 Species	登陆号 Accession	凭证标本 Vouchers	BLAST 结果 Result of BLAST (%)	差异总数 Sum of divergence (bp)
大村鲸 <i>Balaenoptera omurai</i>	MG877683	KorH2	100	0
大村鲸 <i>B. omurai</i>	MG877682	KorH1	100	0
大村鲸 <i>B. omurai</i>	KY963289	IBRC 041401	100	0
大村鲸 <i>B. omurai</i>	KM233838	MauBs_2013_11_03	100	0
大村鲸 <i>B. omurai</i>	AB201257	NSMT-32992	100	0
大村鲸 <i>B. omurai</i>	AB201256	NSMT-32505	100	0
大村鲸 <i>B. omurai</i>	KT757371	Exmouth	100	0
大村鲸 <i>B. omurai</i>	AB116097	NRIFS7	100	0
大村鲸 <i>B. omurai</i>	AB116095	NSMT-M32505	100	0
大村鲸 <i>B. omurai</i>	KX254408	BRA_2010_09_10	100	0
大村鲸 <i>B. omurai</i>	KT582064	NB-11-S014	100	0
大村鲸 <i>B. omurai</i>	AB116096	NRIFS1	99	1
鲸鲸 <i>B. edeni</i>	AF146389	S1	100	0
鲸鲸 <i>B. edeni</i>	AF398372	NJNU0379	100	0
鲸鲸 <i>B. edeni</i>	KY963283	IBRC 040301	82	11
塞鲸 <i>B. borealis</i>	AP006470	——	81	44
布氏鲸 <i>B. brydei</i>	MG877684	H1	80	47
南极小须鲸 <i>B. bonaerensis</i>	KX601048	AM493	80	43

差异总数包括转换、颠换、插入和缺失; “——” 表示未获得相关信息。

Sum of divergence including transitions, transversions, insertions and deletions; “——” No relevant information.

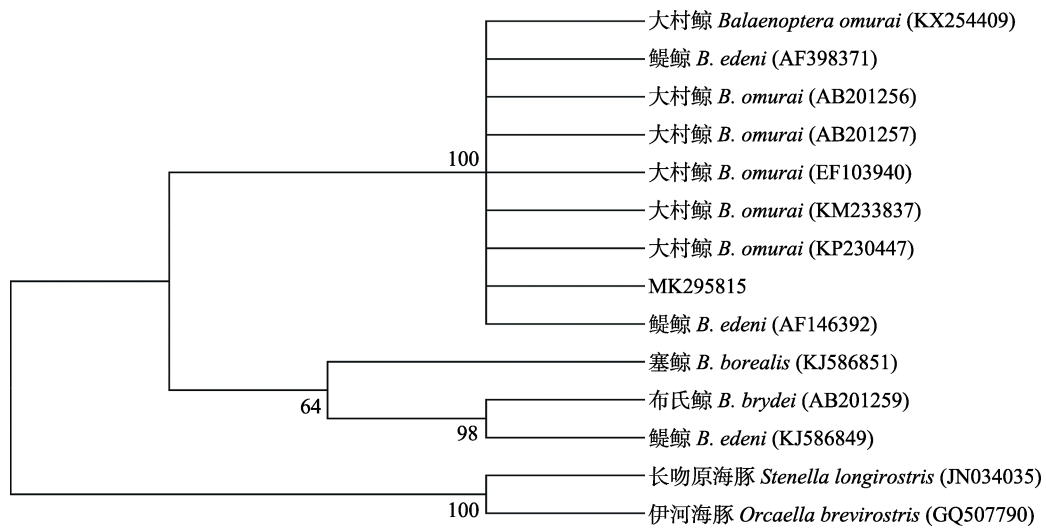


图 5 基于 *Cyt b* 基因部分序列利用最大似然法构建的样本与须鲸科物种及外群物种间的系统发育树
Fig. 5 Phylogram showing relationships among selected species of Balaenopteridae and outgroup, inferred from maximum likelihood (ML) analysis of *Cyt b* sequences

图中数字为自举置信水平值。Values of bootstrap confidence level of the nodes indicated above the branch.

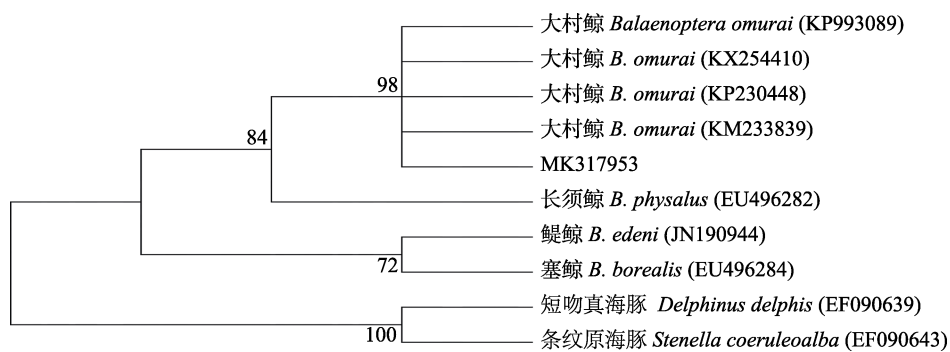


图 6 基于 CO I 基因部分序列利用最大似然法构建的样本与须鲸科物种及外群物种间的系统发育树
Fig. 6 Phylogram showing relationships among selected species of Balaenopteridae and outgroup, inferred from Maximum Likelihood (ML) analysis of CO I sequences

图中数字为自举置信水平值。Values of bootstrap confidence level of the nodes indicated above the branch.

为 100%、98%和 99%。在 *Cyt b* 和控制区序列的系统发育树中，登录号 AF398371 和 AF146392（即凭证标本 NJNV0379 和 S1）的鳁鲸序列同样位于大村鲸序列形成的单系中。

3 讨论

本研究中，由于陈旧骨细胞较之新鲜的组织细胞而言，DNA 提取得率和 PCR 成功率较

低，预实验使用较长 CO I 基因和控制区序列的引物未能扩增出目的片段。由于外界环境的破坏，DNA 分子存在不同程度的碎片化，常用的引物扩增难度大。针对这一问题分别根据鲸类物种 CO I 基因序列 AB201257、KX254410、EF090643 和 EU496282 及控制区序列 AB201257、AB116096、EF682738 和 KJ586813 使用 Primer-BLAST 程序设计出 CO I 基因和控

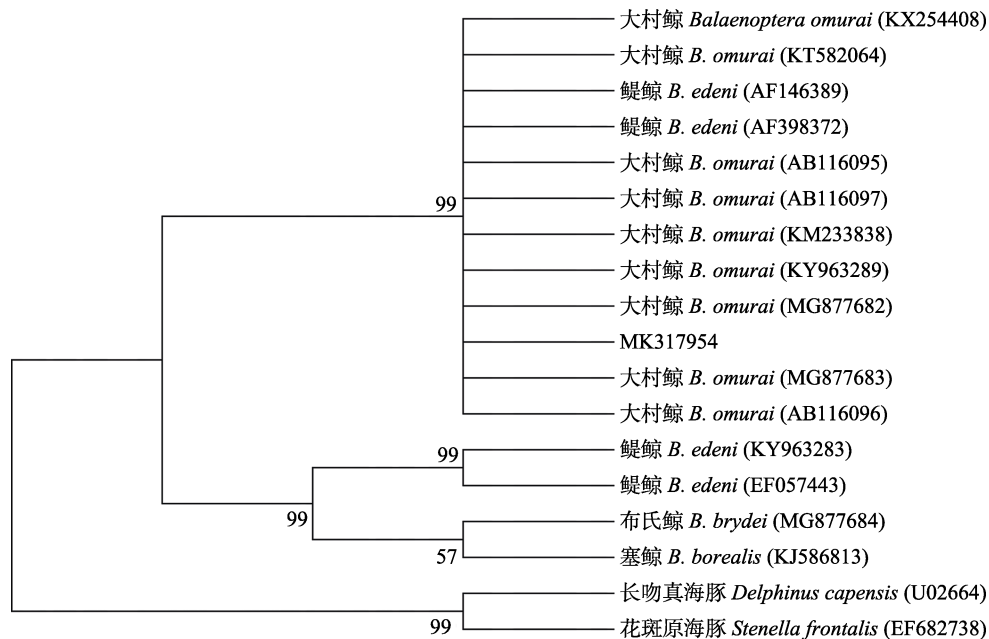


图 7 基于控制区部分序列利用最大似然法构建的样本与须鲸科物种及外群物种间的系统发育树

Fig. 7 Phylogram showing relationships among selected species of Balaenopteridae and outgroup, inferred from Maximum Likelihood (ML) analysis of control region sequences

图中数字为自举置信水平值。Values of bootstrap confidence level of the nodes indicated above the branch.

制区短序列片段引物, 成功获得目的片段。表明针对性地设计特征清晰且长度较短的引物在所提取 DNA 质量不佳时, 能有效提高 PCR 成功率并有利于后续的系统发育分析。

Wada 等 (2003) 根据 9 头采自印度-太平洋及日本海域的须鲸样本发表新种大村鲸, 该物种在我国 (王丕烈 2012)、马达加斯加岛 (Cerchio et al. 2015)、南大西洋 (Cypriano-Souza et al. 2017)、韩国海域 (Kim et al. 2018) 均有分布。我国首次记录于浙江玉环县 (王火根等 2006), 随后在广东硃洲岛 (马牧等 2007) 以及香港、台湾、福建沿海均有发现 (Xu et al. 2017)。杨光等 (2002) 在浙江瑞安采得的鳁鲸标本的 *Cyt b* 序列 (AF398371) 和控制区序列 (AF398372) 与采自所罗门群岛鳁鲸标本 (Yoshida et al. 1999) 的 *Cyt b* 基因序列 (AF146392) 和控制区序列 (AF146389), *Cyt b* 序列完全相同, 控制区序列仅相差 1 bp。随后

所罗门群岛的鳁鲸标本作为新种大村鲸发表 (Wada et al. 2003), 在 GenBank 中序列对应的物种名应改为大村鲸。因此 Rosel 和 Wilcox (2014) 认为杨光等 (2002) 采得的标本也应为大村鲸。本研究中测得序列以及其他大村鲸序列与杨光等 (2002) 采得标本的相应序列形成单系, 支持率分别高达 100% 和 99%, 支持 Rosel 和 Wilcox (2014) 的结论。

致谢 感谢上海科技馆分馆上海自然博物馆张云飞博士和张汤铭先生、上海市渔政监督管理处杨国华先生和梁燕女士、上海动物园程翊欣女士以及上海阿顺特种水产养殖专业合作社黄仁良先生在取样过程中给予的大力帮助与支持。

参 考 文 献

Baker C S, Cipriano F, Palumbi S R. 1996. Molecular genetic identification of whale and dolphin products from commercial

- markets in Korea and Japan. *Molecular Ecology*, 5(5): 671–685.
- Baker C S, Lento G M, Cipriano F, et al. 2000. Scientific whaling: source of illegal products for market? *Science*, 290(5497): 1695–1696.
- Baker C S, Palumbi S R. 1994. Which whales are hunted? A molecular genetic approach to monitoring whaling. *Science*, 265(5178): 1538–1540.
- Cerchio S, Andrianantenaina B, Lindsay A, et al. 2015. Omura's whales (*Balaenoptera omurai*) off northwest Madagascar: ecology, behaviour and conservation needs. *Royal Society Open Science*, 2(10): 150301.
- Cypriano-Souza A L, Meirelles A C O, Carvalho V L, et al. 2017. Rare or cryptic? The first report of an Omura's whale (*Balaenoptera omurai*) in the South Atlantic Ocean. *Marine Mammal Science*, 33(1): 80–95.
- Dalebout M L, van Helden A, van Waerebeek K, et al. 1998. Molecular genetic identification of southern hemisphere beaked whales (Cetacea: Ziphiidae). *Molecular Ecology*, 7(6): 687–694.
- Darriba D, Taboada G, Doallo R, et al. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9(8): 772–772.
- Kim J H, Kim H W, Kim E M, et al. 2018. First record of the Omura's Whale (*Balaenoptera omurai*) in Korean Waters. *Animal Systematics, Evolution and Diversity*, 34(3): 162–167.
- 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 of the United States of America*, 86(16): 6196–6200.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology & Evolution*, 33(7): 1870–1874.
- Rosel P E, Wilcox L A. 2014. Genetic evidence reveals a unique lineage of Bryde's whales in the northern Gulf of Mexico. *Endangered Species Research*, 25(1): 19–34.
- Wada S, Oishi M, Yamada T K. 2003. A newly discovered species of living baleen whale. *Nature*, 426(6964): 278–281.
- Xu M, Wang X, Miao X, et al. 2017. A Stranding Record of Omura's Whale (*Balaenoptera omurai* Yamada, 2003) in the Taiwan Strait, China. *Aquatic Mammals*, 43(3): 289–298.
- Yoshida H, Kato H. 1999. Phylogenetic relationships of Bryde's whales in the western North Pacific and adjacent waters inferred from mitochondrial DNA sequences. *Marine Mammal Science*, 15(4): 1269–1286.
- 马牧, 祝茜, 李响, 等. 2007. 利用 Cyt *b* 基因由未知鲸骨鉴定出大村鲸. *兽类学报*, 27(3): 288–292.
- 王火根, 范忠勇, 沈宏, 等. 2006. 中国大陆海域须鲸科的新纪录. *水产科学*, 25(2): 85–87.
- 王丕烈. 2012. 中国鲸类. 北京: 化学工业出版社, 76–81.
- 杨光, 刘海, 周开亚, 等. 2002. 用 mtDNA 序列鉴定一头小布氏鲸标本. *动物学杂志*, 37(4): 35–38.
- 朱小静, 何鑫, 向余劲攻, 等. 2018. 用 mtDNA 控制区序列鉴定长须鲸标本. *动物学杂志*, 53(2): 234–242.