

用 mtDNA 序列鉴定一头小布氏鲸标本*

杨光 刘海 周开亚 季国庆

(南京师范大学生命科学学院遗传资源研究所 南京 210097)

摘要: 测定了采自浙江省瑞安市的一头须鲸类标本的线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 细胞色素 *b* (cytochrome *b*, *cyt b*) 基因 369 bp 和控制区 (control region) 933 bp 的序列, 通过与已发表的须鲸类同源序列比对, 发现与西太平洋和日本水域的布氏鲸的 *cyt b* 基因和控制区分别有 6.78% ~ 7.05% 和 13.30% ~ 14.40% 的序列差异, 而与来自所罗门群岛的布氏鲸之间 *cyt b* 基因的序列完全相同, 控制区的序列也仅相差一个碱基 (0.28%)。提示与邻近的西太平洋和日本海的普通布氏鲸在遗传上有显著区别, 而可能与所罗门群岛的布氏鲸为同一种, 即小布氏鲸 (*Balaenoptera edeni*)。同时表明, 应用分子生物学手段来进行鲸肉及其制品的种类鉴定是可行和有效的。

关键词: mtDNA; 小布氏鲸; 鉴定

中图分类号: Q959.841, Q75 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2002)04-35-04

Identification of a *Balaenoptera edeni* Specimen by Using Mitochondrial DNA Sequences

YANG Guang LIU Hai ZHOU Kai-Ya JI Guo-Qing

(College of Life Sciences, Nanjing Normal University Nanjing 210097, China)

Abstract: Mitochondrial DNA (mtDNA) cytochrome *b* (*cyt b*) gene (369 bp) and its control region (933 bp) of a stranded Baleen whale from Ruian City, Zhejiang Province were sequenced. The *cyt b* and control region sequences showed 6.78%—7.05% and 13.30%—14.40% divergence with those of Bryde whales living in Japanese and adjacent waters, respectively, whereas the *cyt b* gene was identical to that of Solomon whales and only a 0.28% difference was detected in the control region between them. The data suggest that the present sample is genetically different from Japanese Bryde whales, and should belong to the same species as those in Solomon waters, i. e. Pygmy Bryde whale (Sittang whale or Eden's whale), *Balaenoptera edeni*. The present study proves the feasibility and efficiency of using molecular techniques for species identification of whale meats or related products.

Key words: mtDNA; Small-type Bryde's whale; Identification

国家自然科学基金项目 (No. 39800014, No. 30070116), 国家自然科学基金重大项目 (No. 39899400);

第一作者介绍 杨光, 男, 33 岁, 博士, 副教授; 研究方向: 动物保护遗传学与分子生态学; E-mail: gyang@njnu.edu.cn.

收稿日期: 2001-08-05, 修回日期: 2002-10-15

1994年11月,南京师范大学遗传资源研究所得知在浙江省瑞安市有一头误入内河搁浅死亡的大型鲸类。但当研究人员赶至搁浅地点时,发现该鲸类标本被分割成许多小块,已残缺不全,且大部分被出售。根据当地水产部门提供的资料,该鲸体长约5.95 m,体重约2 000 kg,为一性未成熟个体。虽然根据头顶具有3条不太清晰、也不太完整的纵棱初步判断该个体为布氏鲸(*Balaenoptera* sp.),但并不太确定。

此外,越来越多地提示传统上的布氏鲸应包括两个种,即普通型布氏鲸(*Bryde's whale*) (*Balaenoptera brydei*)和小布氏鲸(*Small-type Bryde's whale* 或 *Eden's whale*) (*B. edeni*),但两者的分布区并不隔离,它们的差别主要在于性成熟时的个体大小^[1]。由于本研究仅有1头性未成熟的不完整个体,显然不可能从外形特征上判断它到底属于其中的哪一个种。

近年来,一些鲸类生物学家开始把DNA分子技术(如mtDNA序列测定)应用于鲸类物种鉴定^[2]及鲸肉及其制品的种类识别^[3,4]。为此,本研究通过线粒体DNA(mitochondrial DNA, mtDNA)上的细胞色素*b*(cytochrome *b*, *cyt b*)基因和控制区(control region)的部分序列,通过与GenBank中下载的须鲸类(蓝鲸*B. musculus*,长须鲸*B. physalus*,塞鲸*B. borealis*,布氏鲸,小布氏鲸,小须鲸*B. acutorostrata*)的同源序列比对,以期为其种类鉴定提供较为确切的分子证据,并验证DNA分子技术在误捕个体和鲸肉及其制品鉴定中的有效性。

1 材料与方 法

本研究通过从肌肉材料中提取总DNA并进行mtDNA *cyt b* 基因和控制区的PCR扩增和测定。样品编号为NJNU0379,保存于南京师范大学遗传资源研究所的-20℃冰箱。取0.1~0.2 g肌肉,用标准的SDS变性、蛋白酶K消化和酚/氯仿抽提方法提取总DNA,具体操作参照Sambrook等^[5]的方法。通过聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)技术扩增*cyt b* 基因和控制区。其中扩增*cyt b* 基因的引物为

L14724和H15149^[6],扩增产物为*cyt b* 基因5'端长度约425 bp的片段;扩增控制区序列的引物为L5'-GAATTCCTCCCGTCTTGTAAC-3'和H5'-TCTCGAGATTTTCAGTGTCTTGCTTT-3'^[7],扩增产物包括了控制区全序列及两侧的部分rRNA序列。扩增产物在PE310型全自动测序仪上进行序列测定。对每一个基因片段,均扩增和测定(同时用轻链和重链引物)二次以避免可能的误差。从GenBank上搜索和下载了近年来发表的须鲸类的*cyt b* 基因和控制区序列,与本研究得到的序列合并,用Clustal X软件^[8]进行序列比对(alignment)。比对结果输入MEGA软件2.0版本^[9]计算本研究所得序列与其它须鲸类序列之间的差异百分比,作为种类鉴定的分子依据。

2 结 果

本研究测定的mtDNA *cyt b* 基因和控制区的序列分别为369 bp和933 bp(图1)。Cyt *b* 基因的碱基组成为G, 30.1%; C, 12.8%; A, 25.8%; T, 31.3%。控制区的碱基组成为G, 12.8%; C, 20.2%; A, 31.6%; T, 35.4%。上述序列已送入GenBank,登录号分别为AF398371(*cyt b* 基因)和AF398372(控制区)。

通过与已发表的须鲸类的相应序列对比,发现本研究测定的序列与西太平洋和日本水域的布氏鲸的*cyt b* 基因和控制区序列差别较大,分别为6.78%~7.05%和13.30%~14.40%。而在日本水域检测到的布氏鲸控制区的3种单倍型之间的序列差异水平为0.28%~0.83%,西太平洋布氏鲸的6种单倍型的序列歧异水平为0.28%~1.66%,东印度洋布氏鲸的2种单倍型的序列歧异为1.11%^[10]。与*Balaenoptera*的其它几种的序列差别也很明显,分别达到4.86%~7.68%(*cyt b*)和3.76%~11.54%(控制区)。与此相对应的是,本研究测定的序列与所罗门群岛的布氏鲸之间非常相似,其中*cyt b* 基因的序列与Yoshida和Kato^[10]从所罗门群岛布氏鲸检测到惟一种*cyt b* 单倍型(S1)完全相同,控制区的序列也仅与该水域布氏鲸的控

A) *cyt b* 基因

AACTGTGAATAGTAAGATAATTCCAATATTTTCATGTTTCTCGAAAGACGTGGGAACCATA
GTATAGGCCTCGTCTATGTGGCGTAGAGGCAGATGAAAAATATGGAGGCTCCGTTTGC
ATGTAGGTATCGGATAATTCAGCCGTAGTTTACGTCTCGGCAAATGTGTGTGACTGATGA
GAAAGCGGTTGTTGTCTCTGGTGTGTAGTGTATTGCTAGGAATAGGCCTGTTAGAATTTG
TGTAATTAAGCAGAGGCCGAGTAGAGAGCCGAAGTTTCATCATGAGGAGATGTTTGATGG
AGTGGGGAGATCAACGAATGCATTGTTGACGATTTTTATTAGTGGGTGTGTTTTTCGGAT
GTTGGTCAT

B) 控制区

GAAAAAGTGTACCTTATACAATAATCACAAAACCACAGTATCTTGTCCGATTGAAAATA
ATTTGTCTTACTACATATTGCCATGTGATTTCGTATATGCTCATGCATTTCCCATGGCTCA
TAATTAATAGTCTCCTCCTATAATTATGTGTATATACATGCTATGTATAACTGTGCATTC
AATTATCTTCACTACGGTAAGTTAAAGCCCGTATTAATTTTTATTAATTTTACATATTAC
ATAATATTTATTAATAGTACAATAGTGCATGCTTATGCATCCCCTGGTCAATTTTATT
CAAATGATTCTTATGGCCGCTCCATTAGATCACGAGCTTAATCACCATGCCGCGTGAAAC
CAGCAACCCGCTCGGCAGGGATCCCTCTTCTCGCACCGGGCCATTAATCGTGGGGGTAG
CTATTTAATGATCTTTATAAGACATCTGGTCTTACTTCAGGGCCATTTAACTTAAAAT
CGCCCACTTCGTTCCCTCTTAAATAAGACATCTCGATGGGTTAATTAATAATCAGCCATG
ATCATAACATAACTGAGGTTTCATACATTTGGTATTTTTTTATTTTTTTGGGGGGCTTG
CACGGACTCCCCTATGACCCTAAAGGTCTCGTCGAGTCAGATAAATTGTAGCTGGGCC
TGGATGTATTTGTTATTTGACTAGCACAACCAACAAGTGCAGTTAAATTAATGGTTACAG
GACATAGTACTCCAAAATTCCCCCGGGCTCAAAAAACTGTATCCCTTAGGGGATCAACC
CCCCCTCCTTCCATACAATACTAACCCTTTGCTTAGATATTCACCACCCCTAGACAGC
TTCCCCCTAGATTTAAAAACCATTTTATTCATAAATCAATACTAAATCTGACACAAGCC
CAATAATAAAAATACATGAACGctATCCCTATCC

图1 测定的 NJNU0379 号样品的 mtDNA *cyt b* 基因和控制区序列

制区单倍型 S1 相差 1 个碱基, 占碱基总数的 0.28%。

3 讨论

布氏鲸是分布于南北纬度 40° 之间的热带和温带水域中的大型鲸类^[11]。分布于东南亚/印度-马来亚水域以及爪哇以南及所罗门群岛的布氏鲸的体型较小, 而被认为是与普通型布氏鲸不同的小布氏鲸^[1]。近年来, 关于布氏鲸到底包括一个种还是两个种, 一直悬而未决^[1]。Dizon 等^[12]通过 mtDNA 控制区序列的系统发生分析, 发现普通型布氏鲸与小布氏鲸并不组成单系, 相反普通型布氏鲸与塞鲸的亲缘关系较近(两者组成单系), 而两者与小布氏鲸的关系均较远, 从而提示布氏鲸的两个形态型可能不属于同一个种。Yishida 和 Kato^[10]也认为, 分布

于所罗门一带的个体与西太平洋和中国东海的布氏鲸在 mtDNA *cyt b* 基因和控制区上均具有显著的差别, 从而认为所罗门一带的个体在遗传上不属于(普通型)布氏鲸。

虽然本研究标本的采集地与日本水域要近得多, 但两个水域的布氏鲸之间的遗传距离却较远, 同时与须鲸属(*Balaenoptera*)的其它种类也有明显的遗传差异, 而中国水域的布氏鲸则与所罗门群岛的个体之间遗传分化程度极小, 两者应同属于小布氏鲸。但 Yishida 和 Kato^[10]认为中国东海的布氏鲸与日本沿岸和西太平洋的布氏鲸为同一种(不同亚种), 因此, 中国水域是否同时有普通型布氏鲸和小布氏鲸的分布及其分布格局, 有必要在今后收集更多的标本来进行验证。

鲸类是一类易于受人类渔业活动影响的动

物。虽然商业性的捕鲸活动已受到国际捕鲸委员会(International Whaling Commission, IWC)的禁止,但误捕仍在许多水域对鲸类有不可忽视的影响^[13]。在一些国家,误捕或直接捕捞的鲸类作为人们十分喜爱的肉食品而经常在当地集市上出售,但由于出售的鲸肉常被分割和加工,给种类鉴定带来很大困难。而准确的物种鉴定,对监测这些国家的渔业对当地水域鲸类的影响并提供真正有效的保护对策是非常重要的。为此,近年来国际鲸类学界已有将分子生物学技术应用到集市出售鲸肉及鲸肉加工产品的物种鉴定,并用于监测一些国家(如日本和韩国)对鲸类的捕捞影响,取得了很好的效果^[3,4]。如果我们能积累足够的种群和个体资料,有时还能够确定这些误捕个体的来源。目前我们对中国水域渔业活动对鲸类的影响,如误捕种类和误捕量等均缺乏准确的资料,结合分子生物学技术与生态学方法开展这方面的调查将是十分必要的和有效的。

参 考 文 献

- [1] Rice D. *Marine Mammals of the World: Systematics and Distribution*. Special Publication No. 4. The Society for Marine Mammalogy, 1998.
- [2] 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.
- [3] Baker C S, Cipriano F, Palumbi S R. Molecular genetic identification of whale and dolphins products from commercial markets in Korea and Japan. *Mol Ecol*, 1996, 5: 671 ~ 685.
- [4] Baker C S, Lento G M, Cipriano F *et al*. Scientific whaling: source of illegal products for market? *Science*, 2000, 290 (5 497): 1 695 ~ 1 696.
- [5] Sambrook J, Fitch E, Maniatis F. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (2nd ed). New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989.
- [6] 杨光,周开亚.淡水豚类分子系统发生的研究.兽类学报,1999,19(1):1-9.
- [7] Hoelzel A, Hancock J, Dover G. Evolution of the cetacean mitochondrial D-loop region. *Molecular Biology and Evolution*, 1991, 8: 475 ~ 493.
- [8] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F *et al*. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 1997, 24: 4 876 ~ 4 882.
- [9] Kumar S, Tamura K, Jakobsen I *et al*. MEGA: molecular evolutionary genetics analysis software, ver 2.0. *Bioinformatics*, 2001, 17(12): 1 244 ~ 1 245.
- [10] Yoshida H, Kato H. Phylogenetic relationships of Bryde's whales in the western North Pacific and adjacent waters inferred from mitochondrial DNA sequences. *Marine Mammal Science*, 1999, 15(4): 1 269 ~ 1 286.
- [11] 周开亚,解斐生,黎德伟等.中国的海兽.罗马:联合国粮食及农业组织,2001.135.
- [12] Dizon A, Lux C, Leduc R *et al*. Molecular phylogeny of the Bryde's/Sei whale complex: separate species status for the pygmy Bryde's form? Report (SC/48/O 27) to the Scientific Committee of the International Whaling Commission, 1996, 1 ~ 15.
- [13] 杨光,周开亚.误捕及其对海兽种群的影响.应用生态学报,1996,7(3):326 ~ 331.