

DOI: 10.3724/SP.J.1035.2012.00403

天鹅洲迁地保护江豚群体的遗传评估与发展预测

周 钊^{1,2} 郑劲松^{1,3} 陈敏敏^{1,2} 赵庆中^{1,3} 王 丁^{1,3}

(1. 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049;

3. 中国科学院水生生物多样性与保护重点实验室, 武汉 430072)

摘要: 文章以 2008 年春季遭受严重雪灾的天鹅洲白鱀豚国家级自然保护区迁地保护江豚群体为研究对象, 利用物种特异性微卫星遗传标记对该群体的遗传多样性进行了评估, 并通过软件对其发展趋势进行了模拟和预测。研究结果表明, 虽然 2008 年春季雪灾并未导致该群体遗传多样性的严重损失, 灾后群体依然表现出中等水平的微卫星遗传多样性(18 个座位的平均等位基因数为 4.780, 平均观察杂合度和期望杂合度分别为 0.748 和 0.674); 但模拟结果显示, 该迁地保护江豚群体的遗传多样性将快速下降, 100 年后仅能保留约 79% 的等位基因和约 84% 的遗传杂合度。此外, 模拟结果表明, 通过增加群体数量和调整群体性比可有效减缓该群体遗传多样性的下降速度。根据研究结果, 并结合长江江豚自然种群快速下降的现状, 作者提出天鹅洲迁地保护江豚群体当前最重要的保护策略应该是尽早补充一定数量的、合适的野生个体, 在加强遗传多样性保护的同时使其群体数量快速增长并形成一个更大规模的有效繁殖群体。

关键词: 长江江豚; 迁地保护; 微卫星; 遗传多样性; 发展预测; 保护策略

中图分类号: Q16; Q34 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2012)03-0403-09

长江江豚(*Neophocaena phocaenoides asiaorientalis*)是仅分布于长江中下游干流及与之相通的大型湖泊中的一种小型齿鲸, 也是江豚(*N. phocaenoides*)三个亚种中唯一的淡水种群^[1]。自 20 世纪 90 年代以来, 由于过度捕捞及非法渔业、水利工程建设、水上交通运输、水体污染等人类活动的直接或间接影响, 长江江豚的种群数量持续快速下降^[2]。2006 年底开展的长江豚类国际联合考察结果表明, 当时其数量约为 1800 头, 且以每年至少 5% 的速度持续下降^[3]。张先锋和王克雄曾利用 VORTEX 模型对长江江豚的种群生存力进行了分析, 认为该种群的灭绝时间可能为 24—94 年, 同时指出建立迁地保护种群可将其灭绝时间推迟至 100 年之后^[4]。目前, 长江江豚为国家二级重点保护动物, 世界自然保护联盟也在物种保护红色名录里将其列为濒危级。

鉴于长江江豚的栖息地环境在较短的时期内不

太可能有明显的好转, 其自然种群仍然会持续快速下降, 迁地保护将是该种群得以长期存活的重要方式^[2]。长江江豚的迁地保护尝试始于 20 世纪 90 年代早期, 在相关单位的努力下, 我国政府目前已在湖北石首天鹅洲故道建立了一个数量维持在 30 头左右的、具有自我繁殖能力的迁地保护江豚群体, 标志着长江江豚的迁地保护措施取得了初步成功^[2]。然而, 研究表明迁地保护种群由于栖息地狭小、群体数量少及与自然种群相隔离等原因, 更易受到突发灾变事件的影响而导致小种群灭绝和迁地保护的失败^[5]。2008 年春季, 我国南方大部分地区遭遇了罕见的、严重的雪灾, 天鹅洲保护区的水面也被冰封。虽然保护区管理处联合中国科学院水生生物研究所等单位及时采取了机械破冰、医疗救护等抢救措施, 化解了该迁地保护江豚群体全军覆没的危险, 但雪灾期间仍先后有 5 头江豚(其中 2 头为妊娠母豚)

收稿日期: 2011-03-30; 修订日期: 2012-01-12

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(2007CB411600); 国家自然科学基金(30730018, 30570252); 湖北省自然科学基金(2010CDB10201)资助

作者简介: 周钊(1982—), 男, 贵州贵阳人; 硕士研究生; 主要从事保护遗传学研究。E-mail: zhouzhao@126.com

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

因冰块割伤感染或年老体衰等原因死亡。鉴于遗传多样性的保护是迁地保护的重要内容,对种群管理和保护策略的制订起重要的指导作用。因此,为了解本次突发雪灾对天鹅洲迁地保护江豚群体遗传多样性的影响,并客观地评估该群体目前的遗传资源状况,本文首次采用 18 个江豚物种特异性和多态性微卫星标记检测该群体的遗传多样性,通过计算机软件模拟预测其未来遗传多样性的发展变化趋势,并根据研究结果提出保护策略。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验样品 本实验所使用的长江江豚样品包括雪灾后 2008 年 4 月初在天鹅洲保护区开展医疗救护时采集的 22 个个体的血液样品(简称为“灾后群体”),以及在雪灾期间采集到的 7 头死亡个体(其中 2 头为胎儿)的组织样品,加上医疗救护行动时采集的 22 个体共 29 个体(简称为“灾前群体”)。样品相关信息(表 1)。

采样方法 活体通过“声驱网捕法”捕捉起水之后采用一次性注射器从尾鳍血管抽取血液,ACD (Acid-Citrate-Dextrose)试剂抗凝血,运回实验室之

后置于-70℃超低温冰箱保存。死亡个体则在尸检过程中采集肌肉等组织样品,并用无水乙醇浸泡保存。

1.2 实验方法

基因组 DNA 提取 血液样品使用基因组抽提试剂盒(上海赛百盛基因技术有限公司)提取 DNA,组织样品则采用传统的蛋白酶 K 消化与苯酚/氯仿抽提法。提取的 DNA 用灭菌双蒸水溶解,通过琼脂糖凝胶电泳进行质量检测,并保存于-20℃冰箱中,用作下游实验的扩增模板。

微卫星标记及扩增条件 本研究共选用 18 个江豚物种特异性微卫星标记(表 2)。引物由上海生工生物技术公司合成,每条正向引物的 5'末端进行 FAM 荧光标记。

PCR 扩增反应体系为: 1×*Taq* Buffer; 0.4 U *Taq* 酶(Biostar, Canada); 50—100 ng DNA 模板; 12.5 μmol/L 的上下游引物各 1 μL; 1.5 mmol/L Mg²⁺; 1.67 mmol/L dNTPs; 补充灭菌双蒸水至 15 μL。扩增程序为: 95℃预变性 7min; 94℃变性 30s, 59.5℃退火 30s, 72℃延伸 30s, 循环 38 次; 72℃延伸 5min。

微卫星等位基因分型及遗传多态性分析 PCR 产物经 8%聚丙烯酰胺凝胶电泳进行扩增效果检测,之后在 ABI3130 遗传分析仪上进行等位基因分型,

表 1 本研究所使用的长江江豚样品信息
Tab. 1 Basic information for Yangtze finless porpoise samples applied in this study

样品编号 Code	性别 Sex	体长 Body length (cm)	年龄 Age (a)	样品编号 Code	性别 Sex	体长 Body length (cm)	年龄 Age (a)
T08M01	♂	133	2.9	T08M16 [#]	♂	155	8.6
T08M02	♂	161	11.3	T08M17 [#]	♂	165	13.4
T08M03	♂	161	11.3	T08F01	♀	136	5.2
T08M04	♂	133	2.9	T08F02	♀	137	5.7
T08M05	♂	110	0.8	T08F03	♀	136	5.2
T08M06	♂	114	1.0	T08F04	♀	146	11.1
T08M07	♂	162	11.8	T08F05	♀	140	7.1
T08M08	♂	160	10.8	T08F06	♀	148	12.8
T08M09	♂	120	1.4	T08F07	♀	152	17.0
T08M10	♂	134	3.1	T08F08	♀	121	1.5
T08M11	♂	118	1.2	T08F09	♀	149	13.8
T08M12	♂	146	5.6	T08F10 [#]	♀	152	17.0
T08M13	♂	142	4.6	T08F11 [#]	♀	133	4.1
T08M14 [†]	♂	57	0	T08F12 [#]	♀	138	6.1
T08M15 [†]	♂	46	0				

注:表中个体的年龄根据张先锋^[6]提出的江豚体长-年龄公式计算得到 ($Y_{\delta}=114.4458X^{0.1410}$; $Y_{\text{♀}}=116.2519X^{0.0947}$; 其中 Y 表示体长, X 表示年龄);“#”表示 2008 年雪灾期间死亡的个体;“†”表示胎儿

Note: Age was estimated by body length according to the experimental formulas described by Zhang^[6] ($Y_{\delta}=114.4458X^{0.1410}$, $Y_{\text{♀}}=116.2519X^{0.0947}$, in which “ Y ” represents body length and “ X ” represents age); “#” indicates individual died during the ice disaster; “†” indicates fetus

表 2 本研究采用的微卫星座位
Tab. 2 Information for microsatellite loci employed in this study

座位 Loci	引物序列 5'→3' Primer sequences 5'→3'	重复单元 Repeat motif	引物来源 References
YFPSSR1	F: TTTGGAAATTGCTAGACTGTGG R: CCTCTTACGCAAGATAAAAGTGG	(AC) ₁₅	[7]
YFPSSR20	F: GGAATCACTTAGGATGCTTTCA R: CCTCTCTGGGTTGTTTCTTGTT	(CA) ₁₇	[7]
YFPSSR47	F: CTGAAGTGGGAAAGCTACAGT R: TAGAGAGTGAGCTTCGGGACTC	(AC) ₃₃	[7]
YFPSSR66	F: AGACTCCAAGTCCACAAGTCT R: CTAGGAGTCTGCAGTCCGAAAG	(AC) ₂₀	[7]
YFPSSR63	F: ACCTGCCATAGCCCTCTTCT R: GTTTTGCGTGGAGTCAGACA	(GT) ₁₈	[8]
YFPSSR75	F: GTTCATGGTTCCAGGGACTG R: CTCCCCAAATTCCCTTTTCT	(AC) ₁₄	[8]
NP391	F: TCCCCGTCACAGTCCCAT R: GAAACACAGAGCACTTGAAT	(GT) ₁₈	[9]
NP409	F: TGGGAGAGGTATAAGTGGCT R: TGGATGGGTGGAAGTAGTT	(GATA) ₃ GAT(GATA) ₉	[10]
NP428	F: CCAGAGAATCAGAACCAATAG R: CCAGAATCACACGAGCCT	(GATA) ₈ (GACA) ₄	[10]
NP464	F: TGGCTGCACTTGCAATTGATG R: CCTAAGAAACCTCTAAATCCA	(GAAA) ₅ A ₂ (GAAA) ₆ GA ₂ G(GAAA) ₅	[11]
YFPSSR5	F: GAGTGGGGTCAAATCAGGAA R: ATGCCTTTGGCTGCATGTAT	(GT) ₁₈	This study
YFPSSR15	F: TGGAAAGAGGCCTTCAGATG R: TGACAGGTCCAAGAGCCAGT	(GT) ₂₂ CT (GT) ₇	This study
YFPSSR22	F: GCTCTCCTTGGCACTTTTCC R: CCTCTCTGCCAGTTTCCTA	(AC) ₁₀	This study
YFPSSR40	F: ATGAATTCTGTCCCCTGTGC R: AGCCAGTTATCTGGCTTCC	(AC) ₁₆	This study
YFPSSR41	F: TGACACAGGGAATTACTTTCAA R: CCATGACCACGACAATAGCA	(GT) ₁₆	This study
YFPSSR43	F: CTTTGCTTTTCGGCACCATA R: CCCTGAAAAACCATGTCTCC	(AC) ₁₀	This study
YFPSSR51	F: TTAGTCAGCTCTCCCCATCC R: TGCACACTCATAATGTACACACA	(GT) ₁₀	This study
YFPSSR73	F: TCCACCTGAGAAGCAAAACC R: GGAAGTGGCATTAGGGTTG	(TG) ₂₂	This study

每泳道均以 ROX500 作为分子量内标, 由 GeneMapper V3.2 分析软件输出分型结果, 并辅以人工核对和校正。

使用 Genepop V4.0 软件^[12]计算雪灾前后群体的等位基因数目(Number of observed alleles, *A*)、观察杂合度(Observed heterozygosity, *H_o*)和期望杂合度(Expected heterozygosity, *H_e*)。使用 Cervus V2.0 软件^[13]计算各座位的多态信息含量(Polymorphism information content, *PIC*)。

保护区江豚群体遗传多样性发展趋势模拟及参数设置 BottleSimV2.6 是一个预测物种遗传多样性发展变化的软件, 它特别适用于长期存活的、世代重叠的物种^[14]。BottleSimV2.6 所支持的第一种模拟是波动种群数量模型下的模拟, 通过该模拟可预测目标种群未来遗传多样性的丧失情况。参数设置为: 平均寿命 20 年^[15,16], 初次性成熟年龄 5 龄^[15,17], 繁殖年龄 5—15 龄, 繁殖期雌性年妊娠率 70%^[4], 生殖周期 2 年^[18], 妊娠和哺乳的重迭率 20%^[18, 19]。此外, 根据样品年龄发现天鹅洲江豚群体中未达到性

成熟个体的雄雌性比为 7 : 2(表 1), 因此本研究设定该群体的出生性比为 3.5 : 1。模拟迭代值为 5000 次。由于天鹅洲江豚群体在 2008 年春季雪灾中损失了部分个体, 为了探讨这次雪灾造成的个体损失对该群体未来遗传多样性发展的影响, 在该部分模拟中分别对灾前群体和灾后群体进行了发展变化预测。

BottleSimV2.6 还支持固定种群数量模型下的模拟, 在该模型下可进行种群数量和性比等参数设置。当设置其中一个参数为固定值时, 可通过模拟得到另外一个参数对未来遗传多样性丧失的影响。进行该部分模拟的目的是希望找出影响天鹅洲江豚群体未来遗传多样性丧失的主要影响因子。

2 结果

2.1 天鹅洲江豚群体的微卫星遗传多样性

由表 3 可看出, 天鹅洲迁地保护江豚灾前群体 18 个座位上的平均等位基因数为 4.940, 平均期望杂合度和观察杂合度分别为 0.687 和 0.734; 而灾后群

体 18 个座位上的平均等位基因数为 4.780, 平均期望杂合度和观察杂合度分别为 0.674 和 0.748。此外, 由于 2008 年春季雪灾造成 7 个个体损失, 导致了 3 个微卫星座位(YFPSSR40, NP391 和 NP428)上的 3 个等位基因丢失。

2.2 天鹅洲江豚群体遗传多样性变化预测

利用 BottleSimV2.6 软件, 波动种群数量模型的模拟结果显示 100 年后: 灾前群体的平均观察等位基因由 4.842 个下降至 3.796 个, 而灾后群体则由 4.543 个下降至 3.588 个(图 1); 灾前群体的观察杂合度由 0.679 下降至 0.577, 期望杂合度由 0.667 下降至 0.567(图 2); 灾后群体的观察杂合度由 0.659 下降至 0.553, 而期望杂合度由 0.644 下降至 0.544(图 2)。若以百分比表示, 则 100 年后天鹅洲迁地保护江豚群体仅能保留约 79%的等位基因和约 84%的遗传杂合度(表 4)。

使用 BottleSimV2.6 软件, 在固定性比的情况下设置不同的种群数量, 对天鹅洲迁地保护江豚群体

未来 100 年主要遗传多样性指标的变化进行了模拟。种群数量分别设置为 100 头、150 头和 200 头。结果显示: 种群数量越大, 遗传多样性下降越慢(模拟曲线未显示), 遗传多样性的损失越小(表 4)。

使用 BottleSimV2.6 软件, 在种群数量相同的情况下设置不同的性比, 对天鹅洲迁地保护江豚群体未来 100 年主要遗传多样性的变化进行了模拟。参数设置为: 种群数量为 100 头; 性比为 4 1、2 1、1 1 和 1 2。结果显示: 当种群性比为 1 1 时, 遗传多样性下降最慢(模拟曲线未显示), 遗传多样性的损失最小(表 4)。

3 讨论

3.1 天鹅洲迁地保护江豚群体的微卫星遗传多样性

Xia, *et al.*曾采用其他鲸类的 13 对微卫星引物通过跨种扩增方式, 对 2002 年夏季天鹅洲迁地保护江豚群体的遗传多样性进行了评估^[20]。与 Xia, *et al.*^[20]的研究结果($n=22$, $A=4.076$, $Ho=0.574$, $He=$

表 3 雪灾前后天鹅洲江豚群体的微卫星遗传多样性
Tab. 3 Microsatellite genetic diversity information for Tian-e-Zhou finless porpoises before and after the snowstorm

座位 Loci	样品数 Sample size		等位基因数 A		观察杂合度 Ho		期望杂合度 He		多态信息含量 PIC	
	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a
YFPSSR1*	29	22	3	3	0.828	0.864	0.635	0.630	0.553	0.542
YFPSSR5	29	22	7	7	0.724	0.864	0.792	0.781	0.751	0.737
YFPSSR15	29	22	3	3	0.621	0.591	0.652	0.627	0.568	0.544
YFPSSR20*	29	22	4	4	0.862	0.818	0.609	0.622	0.521	0.533
YFPSSR22	29	22	4	4	0.724	0.773	0.664	0.646	0.586	0.558
YFPSSR40	29	22	7	6	0.793	0.727	0.775	0.780	0.724	0.725
YFPSSR41	29	22	4	4	0.517	0.545	0.702	0.707	0.629	0.628
YFPSSR43	29	22	3	3	0.655	0.682	0.592	0.572	0.495	0.462
YFPSSR47	29	22	9	9	0.828	0.818	0.859	0.873	0.827	0.837
YFPSSR51	29	22	5	5	0.655	0.591	0.610	0.590	0.559	0.540
YFPSSR63*	29	22	3	3	1.000	1.000	0.581	0.588	0.479	0.484
YFPSSR66*	29	22	4	4	0.931	0.955	0.714	0.728	0.647	0.659
YFPSSR73	29	22	5	5	0.379	0.409	0.754	0.650	0.706	0.593
YFPSSR75	29	22	6	6	0.828	0.818	0.652	0.642	0.595	0.579
NP391	29	22	7	6	0.586	0.636	0.763	0.771	0.715	0.717
NP409	28	22	6	6	0.821	0.864	0.783	0.779	0.732	0.724
NP428	29	22	5	4	0.828	0.909	0.642	0.635	0.575	0.553
NP464	27	22	6	6	0.630	0.591	0.584	0.520	0.548	0.483
Mean			4.94	4.78	0.734	0.748	0.687	0.674	0.623	0.605

注: 表中 a 代表灾后群体; b 代表灾前群体; “*”表示该座位显著偏离哈迪温伯格平衡
Note: “a” represents population after the snowstorm; “b” represents population before the snowstorm; “*” indicates significantly departure from the Hardy-Weinberg Equilibrium

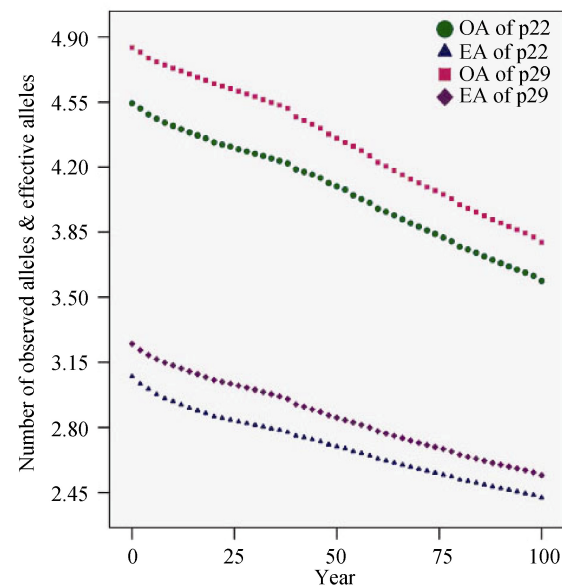


图1 天鹅洲迁地保护江豚群体未来100年内观察等位基因和有效等位基因的变化趋势

Fig. 1 Variations of observed alleles and effective alleles for Tian-e-Zhou *ex situ* conserved Yangtze finless porpoises in 100 years

OA of p22. 灾后群体的观察等位基因; EA of p22. 灾后群体的有效等位基因; OA of p29. 灾前群体的观察等位基因; EA of p29. 灾前群体的有效等位基因

“OA of p22” indicated observed alleles for population after the snowstorm; “EA of p22” indicated effective alleles for population after the snowstorm; “OA of p29” indicated observed alleles for population before the snowstorm; “EA of p29” indicated effective alleles for population before the snowstorm

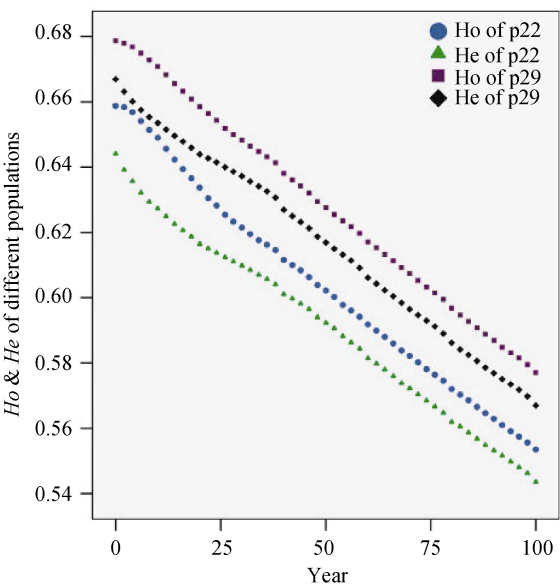


图2 天鹅洲迁地保护江豚群体未来100年内杂合度的变化趋势

Fig. 2 Variations of observed heterozygosity (*Ho*) and expected heterozygosity (*He*) for Tian-e-Zhou *ex situ* conserved Yangtze finless porpoises in 100 years

Ho of p22. 灾后群体的观察杂合度; He of p22. 灾后群体的期望杂合度; Ho of p29. 灾前群体的观察杂合度; He of p29. 灾前群体的期望杂合度

“Ho of p22” indicated observed heterozygosity for population after the snowstorm; “He of p22” indicated expected heterozygosity for population after the snowstorm; “Ho of p29” indicated observed heterozygosity for population before the snowstorm; “He of p29” indicated expected heterozygosity for population before the snowstorm

表 4 不同预测模型下天鹅洲迁地保护江豚群体 100 年后遗传多样性的留存比例

Tab. 4 Reserved genetic diversity of Tian-e-Zhou *ex situ* conserved Yangtze finless porpoises after 100 years under different simulation modules and parameters

预测模型类型及参数 Simulation modules and parameters	观察等位基因 Observed alleles	有效等位基因 Effective alleles	观察杂合度 Observed heterozygosity	期望杂合度 Expected heterozygosity
波动种群数量模型 Variable population size				
灾前群体 Population before the snowstorm	78.39%	78.26%	85.03%	85.02%
灾后群体 Population after the snowstorm	78.96%	78.95%	84.02%	84.40%
固定种群数量模型 Constant population size				
种群性比为 4 : 1 Sex ratio=4 : 1				
群体为 100 头 Population size=100	86.15%	85.90%	91.97%	91.04%
群体为 150 头 Population size=150	91.37%	89.93%	94.66%	93.94%
群体为 200 头 Population size=200	94.08%	92.02%	95.84%	95.35%
种群数量为 100 头 Population size=100				
群体性比 4 : 1 Sex ratio=4 : 1	86.15%	85.90%	91.97%	91.04%
群体性比 2 : 1 Sex ratio=2 : 1	89.28%	89.07%	94.08%	93.31%
群体性比 1 : 1 Sex ratio=1 : 1	90.34%	90.06%	94.72%	93.98%
群体性比 1 : 2 Sex ratio=1 : 2	89.30%	88.98%	94.05%	93.30%

0.5725)相比较, 本文利用 18 对江豚物种特异性微卫星引物对 2008 年春季天鹅洲江豚群体的分析显示

出更高的微卫星遗传多样性($n=29$, $A=4.940$, $Ho=0.734$, $He=0.687$)。Xia, *et al.*认为, 利用其他鲸类的

微卫星引物扩增长江江豚的基因组存在可扩增比例低和多态性水平低的问题,从而可能造成其遗传多样性被低估^[20]。因此,本研究利用江豚物种特异性微卫星引物得到的遗传多样性参数应该能更准确地反映出天鹅洲迁地保护江豚群体的遗传资源状况。

此外,通过与国内其他一些濒危珍稀哺乳动物或种群,如大熊猫(*Ailuropoda melanoleuca*)($H_o=0.574-0.581$, $H_e=0.620-0.779$)^[21]、东北虎(*Panthera tigris altaica*)($H_o=0.605$, $H_e=0.608$)^[22]、川金丝猴(*Rhinopithecus roxellana*)($H_o=0.55-0.67$, $H_e=0.59-0.70$)^[23]、藏羚羊(*Pantholops hodgsonii*)($H_o=0.844$, $H_e=0.838$)^[24]、以及与同属鼠海豚科的非濒危的港湾鼠海豚(*Phocoena Phocoena*)($H_o=0.80-0.86$, $H_e=0.78-0.92$)^[25]和白胸拟鼠海豚(*Phocoenoides dalli*)($H_o=0.792-0.910$, $H_e=0.739-0.906$)^[26]等的微卫星遗传多样性进行比较,可以发现天鹅洲迁地保护江豚群体的微卫星遗传多样性处于中等水平。

迁地保护群体常由于建群者来源地的局限性使得杂合度过剩或者缺失,从而偏离哈迪温伯格平衡。本文研究结果表明,天鹅洲迁地保护江豚群体在 4 个微卫星座位上偏离哈迪温伯格平衡(表 3),这可能和该群体的建群者均来自于武汉以上的湖北石首以及湖南城陵矶等江段,即建群者来源地具局限性有关。同时,不平衡的哈迪温伯格现象意味着群体内部可能存在非随机交配与群体亚分化^[23, 27]。Zheng, *et al.*对长江江豚线粒体 DNA 控制区遗传变异的研究表明,来源于湖北石首江段的江豚,以及来源于湖南城陵矶江段的江豚各拥有一种线粒体单倍型^[28]。由于线粒体 DNA 具有母系遗传的特性,因此,这些不同的线粒体单倍型可能代表了不同的母性谱系,这可能是天鹅洲迁地保护江豚存在群体亚分化的原因。随着该群体的繁殖和壮大,基因流在亚群体间的流动可以使等位基因在群体内的分布重新回归哈迪温伯格平衡^[27]。

3.2 天鹅洲迁地保护江豚群体遗传多样性的发展预测

利用计算机模拟预测濒危物种的灭绝风险已在保护生物学领域广泛应用,例如种群生存力分析(Population viability analysis, PVA)和最小存活种群(Minimum viable population, MVP)分析。这些模拟往往基于研究对象已有比较详实的生物学、生态学和遗传学等基础研究数据积累,进而评估其灭绝风险

并提出合理的保护和管理建议^[29]。Dobson, *et al.*对肯尼亚黑犀牛(*Diceros bicornis*)进行了近交衰退和迁移情况模拟,发现通过迁入外来个体可降低小种群的灭绝风险^[30]。Ballou, *et al.*通过计算机模拟发现,当种群大小为 326—1040 头时可使金头绢毛猴(*Leontopithecus rosalia*)在 100 年后保留 90%的遗传多样性,因此,建议将金头绢毛猴人工圈养种群维持在 500 头左右^[31]。艳丽等^[21]采用微卫星遗传标记对卧龙圈养大熊猫的遗传多样性进行了评估,并利用 BottleSim 软件对其发展趋势进行了预测,认为继续增加野生个体对保持圈养种群遗传多样性的意义不大,从而建议圈养种群的保护策略在于制定有效的繁殖计划以避免近交。

张先锋和王克雄曾使用 Vortex 模型对天鹅洲迁地保护江豚群体的最小存活种群进行了分析,计算得到该群体的最小存活种群数量应该为 20 头,且 80 年后该群体的基因杂合性将会由初始值 1 下至 0.7559^[4]。但当年开展这项研究时并未整合该群体的任何遗传数据,由此得出的结论也有待印证。本研究在利用 18 个物种特异性微卫星标记对天鹅洲迁地保护江豚群体进行遗传资源评估的基础上,使用 BottleSim V2.6 软件对该群体遗传多样性的发展变化进行了模拟预测,期望通过模拟了解该群体未来遗传多样性的变化趋势,找到影响其遗传多样性丧失的主要种群参数,从而为该迁地保护群体保护策略的制订提供科学依据。

本研究使用 BottleSimV2.6 软件,在波动数量模型下对 2008 年春季天鹅洲迁地保护江豚雪灾前后群体遗传多样性的发展趋势进行了预测。结果发现,不管本次雪灾是否发生,该群体的遗传多样性均会快速下降,100 年后仅能保留约 79%的等位基因和约 84%的遗传杂合度(表 4)。模拟结果同时显示,100 年后灾后群体比灾前群体的观察等位基因仅减少 0.209 个(图 1),观察杂合度减少 0.024,期望杂合度减少 0.023(图 2)。因此,本研究认为 2008 年春季雪灾造成的个体损失并未导致该群体遗传多样性的严重丧失。

此外,为了找到影响该群体遗传多样性丧失的主要种群参数,本研究借助 BottleSimV2.6 软件固定种群数量模型的模拟功能,设置了不同种群数量和不同种群性比,预测了不同参数模型下遗传多样性的变化趋势。模拟结果表明:通过增加种群数量可

明显减缓遗传多样性的下降趋势,种群数量越大,遗传多样性的损失越小;种群性比在 1:1 时可使群体遗传多样性下降最缓慢,损失最小(表 4)。

3.3 天鹅洲迁地保护江豚群体的保护策略

保护遗传学的主要目标之一是尽可能保存研究对象的遗传多样性和进化潜力, Soulé, *et al.* 将这个目标确定为在 100 年内保存物种 90% 的遗传多样性^[32]。同时,建群者数量较少的迁地保护种群容易遭遇强烈的瓶颈效应,导致遗传多样性严重丧失,所以在对濒危物种实施迁地保护的过程中必须充分考虑建群者的数量和遗传多样性^[33]。一方面,本文研究结果表明,虽然天鹅洲迁地保护江豚群体在 2008 年春季雪灾之后依然表现出中等水平的微卫星遗传多样性(18 个座位上的平均等位基因数为 4.780,平均观察杂合度和期望杂合度分别为 0.748 和 0.674)(表 3),但模拟结果表明该群体的遗传多样性将快速下降,100 年后仅能保留当前群体约 79% 的等位基因和 84% 的遗传杂合度(表 4)。此外,虽然目前还没有长江江豚自然种群微卫星遗传多样性研究的报道,然而,根据 Zheng, *et al.*^[28] 和 Xia, *et al.*^[20] 对线粒体 DNA 控制区的研究结果,2002 年夏季天鹅洲迁地保护江豚群体中仅检查到其自然种群 7 种线粒体单倍型中的 3 种,也就是说天鹅洲江豚群体最多保存了其自然种群 43% 的线粒体遗传多样性。由此推测,天鹅洲江豚群体的微卫星遗传多样性很可能也与其自然种群存在较大的差距,即目前该迁地保护江豚群体的核 DNA 遗传多样性也可能缺乏足够的代表性。因此,天鹅洲保护区现有的群体数量和遗传多样性均尚未达到保护遗传学对迁地保护群体的要求。另一方面,本文的模拟结果也表明,通过增加种群数量和调整种群性比可明显减缓天鹅洲迁地保护江豚群体遗传多样性的下降速度(表 4)。

综上所述,天鹅洲迁地保护江豚群体当前最重要和最有效的保护策略,应当是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。该策略的实施在增加迁地保护江豚群体遗传多样性的同时,也有助于该群体快速增长形成一个更大规模的有效繁殖群体,从而最终有利于该濒危种群遗传资源的长期保存。此外,由于目前天鹅洲迁地保护江豚群体的建群者多来自于长江武汉以上江段,所以在今后的实施过程中应当考虑从武汉以下江段捕捉合适的补充个体,

以丰富天鹅洲迁地保护江豚群体的遗传多样性。根据生态调查结果,江西鄱阳湖中栖息有一个约为 400 头的江豚群体^[3],并且经实践证明枯水季节比较容易在湖区开展捕豚和暂养操作。因此,只要能妥善解决两个省份不同管理部门之间行政上的审批手续等关键问题,鄱阳湖中的江豚群体可以成为天鹅洲迁地保护江豚群体比较理想的个体补充来源,与此同时也不会对鄱阳湖湖区江豚的就地保护产生较大的影响。

基于 2006 年长江淡水豚类国际联合考察结果,当年长江江豚自然种群的数量约为 1800 头,且以至少每年 5% 的速度快速下降,推算到 2031 年其种群数量将降至 500 头以下^[3]。种群的遗传多样性很可能会伴随其自然种群数量的锐减而逐步丧失。因此,本文为天鹅洲迁地保护江豚群体提出的保护措施应当尽早实施。

致谢:

感谢湖北天鹅洲白鱔豚国家级自然保护区胡良慧主任、高道斌、龚成等同仁和渔民兄弟,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 2008 年春季保护区江豚的雪灾救护行动中付出的努力及在样品采集过程中提供的帮助。感谢 Richard McLaughlin 博士帮助修订本文的英文摘要。

参考文献:

- [1] Gao A L, Zhou K Y. Geographical variation of external measurements and three subspecies of *Neophocaena phocaenoides* in Chinese waters [J]. *Acta Theriologica Sinica*, 1995, **15**(2): 81—92 [高安利, 周开亚. 中国水域江豚外形的地理变异和江豚的三亚种. 兽类学报, 1995, **15**(2): 81—92]
- [2] Wang D. Population status, threats and conservation of the Yangtze finless porpoise [J]. *Chinese Science Bulletin*, 2009, **54**: 3473—3484
- [3] Zhao X J, Barlow J, Taylor B L, *et al.* Abundance and conservation status of the Yangtze finless porpoise in the Yangtze River, China [J]. *Biological Conservation*, 2008, **141**: 3006—3018
- [4] Zhang X F, Wang K X. Population viability analysis for the Yangtze finless porpoise [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 1999, **19**(4): 529—533 [张先锋, 王克雄. 长江江豚种群生存力分析. 生态学报, 1999, **19**(4): 529—533]
- [5] Jiang Z G, Ma K P, Han X G. Conservation Biology [M]. Zhejiang Science & Technology Press. 1997, 98—103 [蒋志刚, 马克平, 韩兴国. 保护生物学. 浙江科学技术出版社.

- 1997, 98—103]
- [6] Zhang X F. Studies on the age determination, growth and reproduction of finless porpoise *Neophocaena phocaenoides* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1992, **16**(4): 289—298 [张先锋. 江豚的年龄鉴定、生长和生殖的研究. 水生生物学报, 1992, **16**(4): 289—298]
 - [7] Zheng J S, Liao X L, Tong J G, *et al.* Development and characterization of polymorphic microsatellite loci in the endangered Yangtze finless porpoise (*Neophocaena phocaenoides asiaeorientalis*) [J]. *Conservation Genetics*, 2008, **9**: 1007—1009
 - [8] Feng J W, Zheng J S, Zhou Z, *et al.* Paternity determination of captivity-bred Yangtze finless porpoises *Neophocaena phocaenoides asiaeorientalis* by microsatellite genotyping [J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2009, **9**(21): 4015—4020 [冯俊伟, 郑劲松, 周钊, 等. 微卫星分型法应用于豢养繁殖长江江豚的父权鉴定. 现代生物医学进展, 2009, **9**(21): 4015—4020]
 - [9] Chen L, Bruford M, Yang G. Isolation and characterization of microsatellite loci in the finless porpoise (*Neophocaena phocaenoides*) [J]. *Molecular Ecology Notes*, 2007, **7**: 1129—1131
 - [10] Chen L, Yang G. Development of tetranucleotide microsatellite loci for the finless porpoise (*Neophocaena phocaenoides*) [J]. *Conservation Genetics*, 2008, **9**: 1033—1035
 - [11] Ku F C. No recent gene flow among three subspecies of genus *Neophocaena* revealed by microsatellite markers [D]. Thesis for Master of Science. National Sun Yat-sen University, Taiwan. 2006
 - [12] Rousset F. Genepop'007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux [J]. *Molecular Ecology Resources*, 2008, **8**: 103—106
 - [13] Marshall T C, Slate J, Kruuk L E B, *et al.* Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations [J]. *Molecular Ecology*, 1998, **7**: 639—655
 - [14] Kuo C H, Janzen F J. BottleneckSim: a bottleneck simulation program for long-lived species with overlapping generations [J]. *Molecular Ecology Notes*, 2003, **3**: 669—673
 - [15] Zhou K Y, Gao A L, Sun J. Notes on the biology of the finless porpoise in Chinese waters [J]. *IBI Reports*, 1993, **4**: 69—74
 - [16] Gao A L, Zhou K Y. Growth and reproduction of three populations of finless porpoise, *Neophocaena phocaenoides*, in Chinese waters [J]. *Aquatic Mammal*, 1993, **19**: 3—12
 - [17] Hao Y J, Wang D, Zhang X F. Review on breeding biology of Yangtze finless porpoise (*Neophocaena phocaenoides asiaeorientalis*) [J]. *Acta Theriologica Sinica*, 2006, **26**(2): 191—200 [郝玉江, 王丁, 张先锋. 长江江豚繁殖生物学研究概述. 兽类学报, 2006, **26**(2): 191—200]
 - [18] Zhang X F, Liu R J, Zhao Q Z, *et al.* The population status of finless porpoise in the middle and lower reaches of the Yangtze River [J]. *Acta Theriologica Sinica*, 1993, **13**(4): 260—270 [张先锋, 刘仁俊, 赵庆中, 等. 长江中下游江豚种群现状评价. 兽类学报, 1993, **13**(4): 260—270]
 - [19] Kasuya T. The population of finless porpoise in the inland sea of Japan [J]. *Scientific Reports of the Whales Research Institute*, 1979, **31**: 1—44
 - [20] Xia J H, Zheng J S, Wang D. *Ex situ* conservation status of an endangered Yangtze finless porpoise population, as measured from microsatellites and mtDNA diversity [J]. *Ices Journal of Marine Science*, 2005, **62**: 1711—1716
 - [21] Yan L, Huang Y, Zhang B W, *et al.* Status and prognosis of genetic diversity in captive giant pandas (*Ailuropoda melanoleuca*) in Wolong [J]. *Acta Theriologica Sinica*, 2006, **26**(4): 317—324 [艳丽, 黄炎, 张保卫, 等. 卧龙圈养大熊猫遗传多样性现状及预测. 兽类学报, 2006, **26**(4): 317—324]
 - [22] Wu J H, Lei Y L, Fang S G, *et al.* Twenty-one novel tri- and tetranucleotide microsatellite loci for the Amur tiger (*Panthera tigris altaica*) [J]. *Conservation Genetics*, 2009, **10**: 567—570
 - [23] Pan D, Li Y, Hu H X, *et al.* Microsatellite polymorphisms of Sichuan golden monkeys [J]. *Chinese Science Bulletin*, 2005, **50**(22): 2489—2494 [潘登, 李英, 胡鸿兴, 等. 川金丝猴群体的微卫星多态性研究. 科学通报, 2005, **50**(22): 2489—2494]
 - [24] Zhou H, Li D Q, Zhang Y G, *et al.* Genetic diversity of microsatellite DNA loci of Tibetan Anlelope (Chiru, *Pantholops hodgsonii*) in Hoh Xil national nature reserve, Qinghai, China [J]. *Journal of Genetics and Genomics*, 2007, **34**(7): 600—607
 - [25] 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 [J]. *Molecular Ecology*, 1999, **8**: S41—S54
 - [26] Escorza-Treviño S, Dizon A E. Phylogeography, intraspecific structure and sex-biased dispersal of Dall's porpoise, *Phocoenoides dalli*, revealed by mitochondrial and microsatellite DNA analyses [J]. *Molecular Ecology*, 2000, **9**: 1049—1060
 - [27] Cornuet J M, Luikart G. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data [J]. *Genetics*, 1996, **144**: 2001—2014
 - [28] Zheng J S, Xia J H, He S P, *et al.* Population genetic structure of the Yangtze finless porpoise (*Neophocaena phocaenoides asiaeorientalis*): Implication for management and conservation [J]. *Biochemical Genetics*, 2005, **43**(6): 307—320
 - [29] Frankham R. Conservation genetics [J]. *Annual Review of Genetics*, 1995, **29**: 305—327
 - [30] Dobson A P, Mace G M, Poole J, *et al.* Modeling the effects of inbreeding depression and immigration on the survival of black rhinoceros populations in Kenya [A]. In: Frankham R, Ballou J D, Briscoe D A (Eds.), *Introduction to Conservation Genetics* [C]. United Kingdom: Cambridge University Press.

- 2002, 405—406
- [31] Ballou J D, Lacy R C, Kleiman D, *et al.* Leontopithecus II: The second population and habitat viability assessment for lion Tamarins (*Leontopithecus*) [C]. Conservation Breeding Specialist Group (IUCN/SSC). 1998
- [32] Soulé M E, Gilpin M, Conway W, *et al.* The millennium ark: how long a voyage, how many staterooms, how many passengers [J]? *Zoo Biology*, 1986, **5**: 101—113
- [33] England P R, Osler G, Woodworth L, *et al.* Effects of intense versus diffuse population bottlenecks on microsatellite genetic diversity and evolutionary potential [J]. *Conservation Genetics*, 2003, **4**: 595—604

GENETIC EVALUATION AND DEVELOPMENT PROGNOSIS ON *EX SITU* CONSERVED YANGTZE FINLESS PORPOISES LIVING IN TIAN-E-ZHOU NATIONAL NATURAL RESERVE

ZHOU Zhao^{1,2}, ZHENG Jin-Song^{1,3}, CHEN Min-Min^{1,2}, ZHAO Qing-Zhong^{1,3} and WANG Ding^{1,3}

(1. Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China; 2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. The Key Laboratory of Aquatic Biodiversity and Conservation of Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China)

Abstract: The Yangtze finless porpoise (*Neophocaena phocaenoides asiaeorientalis*) is a unique freshwater subspecies of *Neophocaena phocaenoides*, which is endemic to the Yangtze River of China and now is critically endangered. As one of the three possible effective conservation measures, an *ex situ* conservation breeding colony has been successfully established for the Yangtze finless porpoise in Tian-e-Zhou Baiji National Natural Reserve, located at Shishou City in Hubei Province. However, in the early spring of 2008, a large snowstorm, lasting several days, led to the death of several porpoises in the reserve. To estimate the genetic loss caused by the snowstorm, a batch of 18 species specific microsatellite markers were employed to investigate the genetic diversity of the colony before and after the snowstorm respectively. Besides, the computer software BottleSimV2.6, was applied to simulate the losing process of genetic diversity in the future. Results indicated that the Tian-e-Zhou *ex situ* conservation colony after the snowstorm still showed moderate level of genetic diversity (for 18 microsatellite loci, $A=4.780$, $H_o=0.748$, $H_e=0.674$). The snowstorm in 2008 did not cause severe genetic loss. Nevertheless, simulation results showed that genetic diversity of the Tian-e-Zhou *ex situ* conservation colony would decline rapidly in the future, if no effective measures were taken. Approximate 79% of the alleles and 84% of the heterozygosity would be reserved after 100 years. Simulations also indicated that lose of genetic diversity would be slowed down by increasing the population size and optimizing the sex ratio. Combining the simulation results from this study and the fact of rapid decline in wild population, the best *ex situ* conservation strategy for Yangtze finless porpoises living in the Tian-e-Zhou National Natural Reserve is to recruit suitable individuals from other wild populations, to establish a larger, more effective breeding population, with much greater genetic diversity.

Key words: Yangtze finless porpoise; *Ex situ* conservation; Microsatellite; Genetic diversity; Development prognosis; Conservation measure