

DOI: 10.3969/j.issn.1000-7083.2011.02.011

扬子鳄的保护遗传学研究进展

朱海涛^{1,2}, 郑涛¹, 吴孝兵^{1*}

(1. 安徽师范大学生命科学学院, 重要生物资源保护与利用研究安徽省重点实验室, 安徽芜湖 241000;

2. 浙江农林大学农业与食品科学学院, 浙江临安 311300)

摘要:保护遗传学是主要研究与灭绝风险相关的遗传因素以及如何利用遗传学管理方法降低物种灭绝风险的科学,是保护生物学和分子遗传学的交叉学科。近几十年来,遗传学研究在生物多样性保护的理论和实践中发挥着越来越重要的作用。本文回顾了 AFLP、mtDNA D-loop、RAPD、微卫星 DNA、MHC 等 DNA 分子标记技术在扬子鳄的样品采集、生物多样性、个体鉴定、繁殖管理、野外放归等保护遗传学方面研究所取得的一些进展。对扬子鳄保护的工作提出了建议:重建扬子鳄的谱系;加大对扬子鳄的放归力度;加强饲养种群之间的基因交流;借鉴密河鳄的管理经验。

关键词:分子标记; 扬子鳄; 保护遗传学**中图分类号:** Q959.6; Q3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7083(2011)02-0301-03

A Review on the Conservation Genetics of *Alligator sinensis*

ZHU Hai-tao^{1,2}, ZHENG Tao¹, WU Xiao-bing^{1*}

(1. College of Life Sciences, Anhui Normal University, Anhui Provincial Key Laboratory of the Conservation and Exploitation of Biological Resources, Wuhu, Anhui Province 241000, China; 2. School of Agriculture and Food Science, Zhejiang Agriculture and Forestry University, Lin'an, Zhejiang Province 311300, China)

Abstract: Conservation genetics, a combination of conservation biology and molecular genetics, is a discipline mainly focusing on the genetic factors related with the risk of extinction and how to lower such risk by employing genetic management methods. In the past few decades, genetic studies have played great roles in the theory and practice of biodiversity conservation. This paper reviewed several molecular marker techniques, including AFLP, mtDNA D-loop, RAPD, microsatellite DNA, and MHC analysis of the Chinese alligator (*Alligator sinensis*), which made several advances in conservation genetics, e. g. sample collection, genetic diversity, individual identification, breeding management, and wild release. Meanwhile, several suggestions about the conservation of *A. sinensis* were put forward: 1. Reconstruct the pedigree of the Chinese alligator, 2. Increase the effort put into wild releases, 3. Enforce gene exchange among breeding populations, 4. Learn management experience from *A. mississippiensis*.

Key words: molecular marker; *Alligator sinensis*; conservation genetics

扬子鳄 *Alligator sinensis* 又名鼉、土龙、猪婆龙,隶属于鳄目 Crocodylia 鼉科 Alligatoridae 鼉属 *Alligator*。它是中国特有的珍稀濒危物种,也是世界上现存 23 种鳄中最濒危的物种之一(Thorbjarnarson, 1992)。历史上,扬子鳄曾广泛分布于长江和黄河流域,由于栖息地生态环境的恶化、气候的变化、人类的稻作生产及捕杀造成了扬子鳄数量急剧减少(李晓春等, 2006)。如今,只有不超过 150 条野生扬子鳄分布于安徽省宣州地区(Thorbjarnarson *et al.*, 2002)。为了保护这一物种,自 20 世纪 70 年代末以来,我国先后建立了安徽宣城扬子鳄繁殖研究中心(ARCCAR)和浙江长兴扬子鳄自然保护区。ARCCAR 建于 1979 年,是中国最大的扬子鳄繁殖研究中心,

其奠基种群数量为 212 条野生鳄,但有效种群数量仅 70 多条,经过 20 多年的繁育研究,ARCCAR 的扬子鳄种群数量已经超过 10 000 条;浙江长兴扬子鳄自然保护区目前的 450 条饲养鳄是 4 条亲本野生鳄的后代,其有效种群数量则更少,近亲繁殖难以避免。因此,对扬子鳄的保护遗传学研究刻不容缓。运用现代分子生物学技术分析现存扬子鳄种群的遗传现状并制定科学的管理策略,是当前扬子鳄保护的一个重要环节。近年来,随着分子生物学技术的突飞猛进,不同的分子标记技术已被用于扬子鳄的遗传变异、种群结构、个体识别、亲缘鉴定等保护遗传学方面的研究。

随着近十年分子遗传学的迅速发展,濒危物种的保护管

收稿日期:2010-03-15 接受日期:2010-05-28

基金项目:国家自然科学基金(No. 30770312);安徽师范大学动物生物学优秀创新团队和生物环境与生态安全安徽省重点实验室经费资助

作者简介:朱海涛(1983~),男,硕士研究生,研究方向:保护遗传学, E-mail: spectrin2006@yahoo.com.cn

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: wuxb@mail.ahnu.edu.cn

理和生物多样性保护出现了革命性的发展,同时也使保护遗传学的研究内容和研究方法不断拓展和完善。目前保护遗传学已成为保护生物学研究的一个核心部分(Smith & Wayne, 1996)。保护遗传学的主要研究目标是保护物种遗传多样性(Genetic diversity)和保持物种进化潜力(Evolutionary potential)。其研究内容主要包括种群遗传结构(Population genetic structure)、近亲繁殖(Inbreeding)、遗传变异(Genetic variation)、基因流(Gene flow)、杂交(Hybridization)、迁移(Migration)、亲属关系(Kinship)、有效种群大小(Effective population size)、种群的亚分化(Population subdivision)以及确定进化显著单元(Evolutionary significant unit, ESU)。本文对扬子鳄的保护遗传学研究做了简要回顾和总结。

1 扬子鳄的保护遗传学研究

1.1 取样

常用的取样方法包括伤害性取样(destructive sampling)、非伤害性取样(nondestructive sampling)和非损伤性取样(noninvasive sampling)(Taberlet *et al.*, 1999)。扬子鳄的取样方法同样有这 3 种。前两种取样方法是基于对扬子鳄的伤害而得到样品,对于扬子鳄的保护极为不利。近年来,随着非损伤取样技术的建立,已能从扬子鳄卵壳膜中提取 DNA 用于研究,避免了尾静脉抽血对扬子鳄造成伤害(Hu & Wu, 2008)。

1.2 种群遗传多样性研究与应用

在扬子鳄的管理和种群保护中,种群遗传多样性与遗传结构分析一直是倍受关注的热点,因为它是确定种群保护管理单元(Management unit)及保护等级的基础。多种分子标记方法,如 AFLP(Amplified Fragment Length Polymorphism)、mtDNA D-loop、RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA)、微卫星 DNA、MHC 等方法都被用来研究扬子鳄种群的遗传多样性。

黄磊和王义权(2004a)利用 RAPD、mtDNA D-loop 区、密河鳄的微卫星位点跨种扩增扬子鳄,分析了标记在个体识别中的应用,重建扬子鳄饲养种群的谱系,提出了扬子鳄饲养种群的保护策略。

Wang 等(2006)采用 AFLP 方法,研究了来自安徽宣州和浙江长兴共 47 条扬子鳄的遗传多样性。结果显示扬子鳄的多态信息含量(PIC)介于 0.0417~0.04817,并且与扬子鳄的两次瓶颈效应相吻合,即第 1 次是由于栖息地丧失造成扬子鳄数量的急剧减少;第 2 次是由于奠基者效应造成了种群遗传多样性的降低,得出宣州种群和长兴种群实际上是一个种群,或者宣州种群和长兴种群由于地理距离较近而没有产生遗传分化的结论。给出了保护建议:给予多态性高的个体更多的繁殖机会,多态性低的个体给予较少的繁殖机会。

利用 MHC 研究种群遗传多样性的特点在于它是一个功能基因。MHC 的变异可反映基因组水平的变异,因此通过 MHC 基因的变异分析,可有效地评估种群遗传多样性水平。Liu 等(2007)研究了来自宣州、长兴和野生种群共 14 个个体的 MHC 序列,对 72 个克隆进行测序得到了 34 条核苷酸序列。研究结果表明,长兴种群的核苷酸多样性水平高,野生

种群的多样性水平低。

微卫星 DNA 广泛分布于真核生物基因组中,具有多态性高、共显性遗传、选择中性、易于操作等特点,是一种极具应用价值的分子遗传标记,近年来在濒危动物保护遗传学研究中得到越来越多的应用。Xu 等(2005)采用来自密西西比鳄的 22 个微卫星位点跨种扩增 32 条长兴扬子鳄,8 个多态性较好的位点得到 26 个等位基因。等位基因的数量介于 2~5,平均 3.25,平均 PIC 为 0.4561,显示长兴扬子鳄的遗传多样性水平较高。Jing 等(2008)以长兴扬子鳄和在美国生活了 50 年左右的扬子鳄为模板筛选出 11 个微卫星位点,其中 4 对位点发现显著的连锁不平衡,2 个位点偏离 Hardy-Weinberg 平衡。Zhu 等(2009)采用磁珠富集法筛选出 10 个扬子鳄的微卫星多态位点,没有发现连锁不平衡现象;同时采用 10 个扬子鳄微卫星位点研究了宣州、长兴和野生扬子鳄种群的遗传多样性(论文待发表)。

1.3 物种鉴定和个体识别

现存鳄中,许多种类形态上十分相似,给鉴定分类工作带来了困难。通过使用分子遗传学的手段如序列分析,能提高鉴定的准确性。Yan 等(2005)在比对了 10 种鳄的 mtDNA *cyt b* 基因后,设计出了一对识别扬子鳄的特异性引物,并在一个案例中成功应用。在个体识别上,微卫星 DNA 分子标记以其高度灵敏性可望成为扬子鳄研究的有力工具之一。黄磊和王义权(2005)采用 8 个微卫星位点对扬子鳄的个体识别进行研究,其累计个体识别率与累计父权排除率分别达 0.9968 和 0.7697,mt VNTR 的个体识别率为 0.9146,联合 SSR 与 mt VNTR 两种分子标记的累计个体识别率理论值达 0.9997,并在实际分析中能将 39 个扬子鳄个体完全区分开,其区分能力较 RAPD、AFLP 及 mtDNA D-loop 区等分子标记要高。

1.4 饲养繁殖及遗传管理

在扬子鳄的饲养繁殖中,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,需要进行奠基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。分子标记技术能够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。对不同种群扬子鳄遗传组成的分析发现,扬子鳄的饲养种群遗传组成普遍单一、多样性程度偏低,这对生活在种群密度高的环境中的扬子鳄的生存是不利的,容易发生近交衰退或集体感染疾病事件。这一结果对扬子鳄饲养种群的遗传管理有实际意义。

1.5 野外放归工作的开展

既然很多学者采用不同的分子方法证明了扬子鳄种群的遗传多样性水平很低,那么如何避免扬子鳄的近亲交配就成了一项重要的课题,而其中一项行之有效的措施就是挑选扬子鳄放归野外,补充到野生种群中。以往扬子鳄的野外放归仅仅是从形态学上观察扬子鳄的健康状况,然后按照一定的雌雄比例进行野外放归。随着分子生物学技术的发展,扬子鳄野外放归的依据不仅仅局限于健康状况,而开始转向微生物、分子生物学等方向。麻荣荣等(2008)从 25 条准备进行野放的扬子鳄泄殖腔中筛选出 13 种形态不同的菌株,经

分析,除了未分类的菌之外,其余菌株都是非致病性,而且不同于扬子鳄生活水体中分离的菌株,因此可以认为这些扬子鳄是健康的,可以野放。由于从标记为 AS12 的扬子鳄体内分离到一个分类地位尚未确定的菌,对它的生理生化特征进行了检测,但这种菌的致病性方面特征尚不清楚,建议不考虑野放 AS12 个体。Yan 等(2006)采用 AFLP 方法从 43 条健康的候选鳄(29 雌,14 雄)中,筛选出 6 条遗传距离较远的个体进行野外放归。Zhu 等(待发表)采用 10 个扬子鳄微卫星位点从 22 条饲养鳄中筛选出 6 条遗传相关性较远的个体进行野外放归。

2 结语和展望

DNA 分子标记技术的迅猛发展极大地推动着扬子鳄保护遗传学研究的开展和深入。对扬子鳄保护遗传学的研究虽然起步很晚,但仍然取得了一定的科研成果。在对其研究结果进行评价时应注意,仅仅应用分子标记对扬子鳄的种群遗传学进行研究虽然有一定的代表性,但部分扬子鳄个体并不能代表整个扬子鳄种群。

扬子鳄基因的单一化非常显著,这种情况将会进一步导致其种群适应能力下降。对于物种而言,保护好它的遗传多样性将提高其存活机会(Avise, 1994)。为了抑制扬子鳄遗传多样性丧失,未来的工作应该重点围绕在扬子鳄的谱系重建、加大扬子鳄的放归力度、加强饲养种群之间的基因交流等方面。

为了保护扬子鳄的物种遗传信息,建立种质资源库来保存现有扬子鳄的种质资源十分必要。扬子鳄与密河鳄分类上同为一属,但密河鳄的遗传多样性比扬子鳄要高(黄磊,王义权, 2004b)。因此应该借鉴密河鳄保护的经验和措施结合起来,才能更有效地保护扬子鳄这一孑遗物种。

3 参考文献

- 黄磊, 王义权. 2004a. 扬子鳄分子遗传学与遗传多样性研究现状[J]. 动物学杂志, 39(5): 101~104.
- 黄磊, 王义权. 2004b. 扬子鳄种群的微卫星 DNA 多态及其遗传多样性保护对策分析[J]. 遗传学报, 31(2): 143~150.
- 黄磊, 王义权. 2005. 使用 SSR 和 mtVNTR 分子标记识别扬子鳄个体[J]. 动物学报, 51(3): 501~506.
- 李晓春, 吴孝兵, 马陵合. 2006. 我国古代扬子鳄减少原因考证[J].

- 动物学杂志, 41(1): 137~142.
- 麻荣荣, 吴孝兵, 江红星, 等. 2008. 野放前候选扬子鳄泄殖腔的细菌鉴定[J]. 动物学研究, 29(3): 253~259.
- Avise JC. 1994. Molecular markers, natural history and evolution[M]. New York: Chapman and Hall.
- Hu Y, Wu XB. 2008. Eggshell membranes as a noninvasive sampling for molecular studies of Chinese alligators (*Alligator sinensis*) [J]. African Journal of Biotechnology, 7(17): 3022~3025.
- Jing W, Wang XL, Lan H, et al. 2008. Eleven novel microsatellite markers for the Chinese alligator (*Alligator sinensis*) [J]. Conserv Genet: 10(3): 543~546.
- Liu Hui, Wu Xiaobing, Yan Peng, et al. 2007. Polymorphism of Exon 3 of MHC Class II B Gene in Chinese Alligator (*Alligator sinensis*) [J]. Journal of Genetics and Genomics, 34(10): 918~929.
- Smith TB, Wayne RK. 1996. Molecular Genetics Approaches in Conservation[M]. Oxford University Press.
- Taberlet P, Waits LP, Luikart G. 1999. Noninvasive genetic sampling: look before you leap[J]. Trends in Ecology & Evolution, 14(8): 323~327.
- Thorbjarnarson JB, Wang XM, Shao M, et al. 2002. Wild populations of the Chinese alligator approach extinction[J]. Biological Conservation, 103(1): 93~102.
- Thorbjarnarson JB. 1992. Crocodiles, an action plan for their conservation [M]. Switzerland: IUCN, Gland.
- Wang YQ, Zhu WQ, Huang L, et al. 2006. Genetic diversity of Chinese alligator (*Alligator sinensis*) revealed by AFLP analysis: an implication on the management of captive conservation[J]. Biodiversity and conservation, 15(9): 2945~2955.
- Xu QH, Fang SG, Wang ZP, et al. 2005. Microsatellite analysis of genetic diversity in the Chinese alligator (*Alligator sinensis*) Changxing captive population[J]. Conservation Genetics, 6(6): 941~951.
- Yan P, Wu XB, Shi Y, et al. 2005. Identification of Chinese alligators (*Alligator sinensis*) meat by diagnostic PCR of the mitochondrial cytochrome b gene[J]. Biological Conservation, 121(1): 45~51.
- Yan P, Wu XB, Wang YY, et al. 2006. AFLP analysis of genetic variation on captive-bred Chinese alligators: an application to select individuals for release[J]. Zoo Biology, 25(6): 479~490.
- Zhu HT, Wu XB, Xue H, et al. 2009. Isolation of polymorphic microsatellite loci from the Chinese alligator (*Alligator sinensis*) [J]. Molecular Ecology Resources, 9(3): 892~894.