

综述

分子生物学方法在鲸类学研究中的应用

郑劲松 何舜平 王丁

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

APPLICATIONS OF MOLECULAR TECHNIQUES IN CETACEA RESEARCH

ZHENG Jir Song, HE Shun Ping and WANG Ding

(Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072)

关键词: 系统发育; 血亲鉴定; 社群行为; 性别鉴定; 种类鉴定; 物种保护

Key words: Phylogeny; Kinship test; Social behavior; Sex determination; Species identification; Species conservation

中图分类号: Q958.8 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2003)03-0286-05

80年代以来, 随着分子生物学的迅猛发展, 涌现出一批分子进化和种群遗传分析方法和技术。如同工酶(Allozymes)分析、分子杂交(Molecular hybridization)、限制性片段长度多态性(Restriction fragment length polymorphism, RFLP)等。而聚合酶链式反应(Polymerase chain reaction, PCR)技术的诞生则给分子生物学及其相关学科带来了一场革命。以PCR技术为基础, 发展出随机扩增多态DNA(Randomly amplified polymorphic DNA, RAPD)、扩增片段长度多态性(Amplified fragment length polymorphism, AFLP)、微卫星(Microsatellite, MS)等分析方法和技术。这些方法和技术与传统方法相比具有一些独特的优势, 因而很快便在生物学各个领域特别是种群遗传研究中得到广泛应用。随着不同研究领域的交叉和渗透, 它们很快被引入到鲸类学的有关研究中。如通过分析某一基因片段序列, 如线粒体DNA控制区(Mitochondrial control region)、细胞色素b(Cytochrome b)等来研究鲸类的遗传变异、种群结构和系统发育等^[1-8]。此外, RAPD、AFLP、RFLP、DNA指纹图谱技术(DNA fingerprinting, DNAP)等也在鲸类学有关研究中得到了广泛应用。本文主要介绍分子生物学方法在鲸类学研究中的进展, 并讨论了它们在白豚(*Lipotes vexillifer*)和江豚(*Neophocaena phocaenoides*)保护生物学研究中的应用前景。

1 鲸类学研究中的分子生物学方法

1.1 DNA分子系统学用于研究鲸类的起源和系统发育

由于鲸类在形态上高度特化, 并且缺少关键的化石标本, 使得人们很难确定其起源。不少学者基于一些解剖、生

理和古生物学方面的证据认为鲸类与偶蹄类有密切的进化关系^[9,10]。Milinkovitch利用分子杂交的方法通过比较DNA分子间解链温度的差异系数来了解不同物种之间的亲缘关系, 认为偶蹄类是鲸类的祖先^[11]。Milinkovitch等还根据两个核糖体DNA片段的序列(12S rRNA和16S rRNA)利用分子系统学的方法构建了鲸类的系统发育进化树, 发现鲸类与偶蹄类具有很密切的进化关系^[12]。传统的鲸类分类依据头骨是否对称、牙齿和鲸须的有无、是否具有回声定位能力等解剖学、生理学和行为上的特征将现生鲸类划分为具有回声定位能力的齿鲸亚目(Odontoceti)和滤食性须鲸亚目(Mysticeti)两大类群。齿鲸亚目又被分为包括10个科在内的4大类群: 抹香鲸类, 即抹香鲸总科(Physeteroidea), 包括抹香鲸科(Family physeteridae)和小抹香鲸科(Kogiidae); 哺鲸类, 即喙鲸总科(Ziphoidea), 只有喙鲸科(Ziphiidae)一科; 淡水豚类, 即淡水豚总科(Platanistioidea), 包括恒河豚科(Platanistidae)、拉河豚科(Family pontoporiidae)、亚河豚科(Iniidae)和白豚科(Family lipotidae); 海豚类, 即海豚总科(Delphinoidea), 包括一角鲸科(Monodontidae)、海豚科(Delphinidae)和鼠海豚科(Phocoenidae)^[13]。长期以来齿鲸亚目和须鲸亚目被认为是单系起源的, 其共同的祖先是生活于约3,500—4,500万年前的古鲸亚目^[14]。自从Milinkovitch提出齿鲸类的并系起源, 并且抹香鲸和须鲸亚目在进化上关系更接近这一观点以来^[12], 抹香鲸的系统进化位置便争议颇多。随后, 许多研究人员依据不同的基因序列(线粒体细胞色素b、核糖体12S和16S等)进行分子系统学研究均发现这样一个奇怪的现象: 齿鲸

收稿日期: 2002-05-28; 修订日期: 2002-12-01

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 30170142); 中科院创新项目(KSCX2-F-03)和水生所领域前沿项目(220103)资助

作者简介: 郑劲松(1975—), 男, 湖北省咸宁市人; 博士研究生; 主要从事鲸类保护生物学研究

通讯作者: 王丁

中的抹香鲸在进化上与须鲸而不是人们想象中的齿鲸关系更近, 这表明齿鲸类并非单系起源的。依据分子钟理论, 可推测它们的共同祖先生活在 1,000—1,500 万年前^[6,12]。很显然, 这样的研究结果与传统的结论相冲突。最近, Nikaido 等运用短的散布因子(SINE)来分析主要鲸类的谱系发生, 发现齿鲸类是单系起源的; 他们还推算出现生鲸类大约在距今 2,800—3,300 万年前快速辐射分开^[15]。这一时间与化石记录十分吻合。齿鲸类到底是不是单系起源的呢? 恐怕这一问题在今后很长一段时间内依然会是争论的焦点, 除非有新的关键的化石标本出现。

另外一个有争议的问题是淡水豚类之间的关系。淡水豚类包括: 恒河豚(*Platanista gangetica*)和印河豚(*P. minor*)、亚河豚(*Inia geoffrensis*)、拉河豚(*Pontoporia blainvilie*)和白豚。它们零星地分散于三个亚大陆的六条隔离的河流。由于淡水豚类的外型和栖息地环境相似, 出于命名方面的方便, 长期以来它们一直被置于同一个较高的分类单元——淡水豚总科。然而, 这一分类是否合适? 最近有形态学家依据它们的骨骼存在明显差异对这一类群的单系起源提出了质疑^[13]。Cassens 等通过对三个线粒体基因(12S rRNA, 16S rRNA, cytochrome b)和二个核基因(编码光感受器内部与类维生素 A 相结合蛋白质的基因, 乳蛋白基因)的序列进行系统发育分析, 认为现生淡水豚类并不是单系起源的^[16]。他们认为淡水豚类是由于适应河流栖息地而保存下来的残留物种。然而, Nikaido 等运用 SINE 来分析主要鲸类的谱系发生时得到的结论是淡水豚类为单系类群^[15]。然而, 不管它们是否单系起源, 它们肯定属于不同的科属。杨光等最近的研究结果将淡水豚类分为三个支系, 即恒河豚、白豚、印河豚和拉河豚, 并且支持白豚成为独立的科^[18]。

1.2 DNA 指纹图谱技术用于血亲关系鉴定(Kinship test)

遗传学手段在鲸类研究中的一个重要应用是对个体间的血亲关系进行鉴定。Jeffreys 等第一次用杂交的方法证实了人类基因组中小卫星(Minisatellite)高变区的存在, 并正式提出小卫星这个术语, 奠定了 DNA 指纹技术的基础^[17]。该技术的基本原理是: 动物个体的 DNA 指纹图谱中的每一条带除了偶然发生的突变外, 都可以从其父母双方的 DNA 指纹中找到。DNA 指纹图谱技术在血亲鉴定和法医鉴定中表现出积极的作用和有效性。随着该技术的日益成熟, 它被应用于鲸类的父权鉴定(Paternity test)。Hoelzel 等运用该技术(使用 33.15 和 33.6 探针)成功地对人工豢养条件下的 4 头虎鲸(*Orcinus Orca*) (其中母子可以确定, 而另外两头均可能是父亲)进行了亲子关系鉴定^[18]。

1.3 指纹图谱分析用于鲸类社群行为的研究

由于鲸类不容易接近, 因而要了解它们的社群行为特别是生殖行为通常很困难。有关鲸类交配体系的知识通常是从其他哺乳动物相比较推测得到的, 然而, 这种推测结果需要通过严格的亲子鉴定来证实。就哺乳动物的交配体系而言, 已经知道雌性的交配行为主要受怀孕和哺乳期的限制, 而雄性则主要通过两种途径来优化它们在群体中的适应

性: 与很多雌性交配或通过亲体保护来提高后代的数量和质量^[19]。在大多数情况下, 这种交配体系主要通过两性或单性(通常是雄性)向外扩散来避免近交的发生^[20]。然而, Amos 等通过对长肢圆头鲸(*Globicephala melas*)两个群体的 1 个小卫星和 6 个微卫星位点指纹图谱的分析得到与此完全不同的结论——该物种群体内两种性别的后代都不迁移, 而且性成熟雄性基本上不与家族群内的雌性交配^[21]。这一情况对于哺乳动物来说是很不正常的, Amos 推测这种社群结构可以通过雄性帮助雌性抚育后代和获取食物来提高整个群体的广义适合度。这一说法缺少事实依据, 但在很大程度上可以解释长肢圆头鲸家族群异乎寻常的凝聚力。至于它们的交配行为, Amos 估计只有当两个或更多的家族群相遇或者雄性个体造访其他家族群时才会发生。这两种可能性均得到野外观察资料支持, 但企图通过亲子鉴定来寻找真正父亲的努力常常以失败告终。总而言之, 该方法为研究哺乳动物的社群行为开辟了一条崭新的道路。

1.4 PCR 技术用于性别鉴定

鲸类学家们在研究鲸类的生物学和行为规律时有必要区别雌雄个体, 但对于生活在海洋环境中的鲸类群体来说通常是很困难的, 在很多情况下甚至是不可能做到的。以往对鲸类进行性别鉴定主要是依据肉眼可以看出的明显的性征作出判断。在野外条件下, 这一作法只适用于近距离个体, 而且仅限于座头鲸(*Megaptera novaengliae*), 抹香鲸(*Physeter macrocephalus*), 虎鲸等少数具有明显性别特征的种类。摄影技术的应用, 使得人们可以依据照片上明显的性征对较远距离处的个体进行性别鉴定。但这一技术并不总是可靠的, 而且不可能在任何条件下对所有的个体进行性别鉴定。过去也有研究表明通过对组织或细胞进行核型分析来确定性别^[22,23], 但这一作法操作麻烦而且费时。另外, 传统的方法无法对保存的缺少性别资料的组织或器官进行性别鉴定。

近几年来, PCR 及其相关技术的快速发展使得人们可以从分子水平上对哺乳动物进行性别鉴定。该技术以性别特异性 DNA 序列为为基础, 通过 PCR 扩增性染色体上的特定区域 ZFX/ZFY^[24] 和 SRY^[25], 并对扩增产物进行检测从而对性别作出判断。该方法具有快速、可靠、需样品量少等优点。对于野外自然状态下的个体, 则可以通过活体无损伤方法获得样品, 这一点对于濒危鲸类物种的保护研究意义重大。该方法最常用的有两套检测系统: ZFX/ZFY 和 SRY。ZFX/ZFY 系统通过 PCR 扩增得到目的基因片段, 再用限制性内切酶 Taq I 消化, 依据酶切图谱对性别作出判断。SRY 检测则相对简单, 不需经过酶切而通过电泳方法直接检测雄性特异性扩增条带。Palsbø¹¹ 等利用这两套检测系统对人和 6 种鲸[小须鲸(*Balaenoptera acutorostrata*)、蓝鲸(*B. musculus*)、长须鲸(*B. physalus*)、座头鲸、白鲸(*Delphinapterus leucas*)和鼠海豚(*Phocoena phocoena*)]进行性别鉴定^[26]。结果在使用 ZFX/ZFY 系统时除了不能从长须鲸的基因组中得到性别特异性条带, 人类和其余 5 种鲸的性别均能得到准确的鉴定; 而在使用 SRY 系统时, 则无一例外地可以进行性别鉴定。由此看

来, SRY 系统似乎更可靠。所以他建议在对鲸类和其他哺乳动物进行性别鉴定时为了得到可靠的结论最好单独扩增 SRY 区段或同时扩增 ZFX/ZFY 区段作为平行对照。在 Palsbø 11 等工作的基础上, Richard 等人测出了抹香鲸的 SRY 基因序列, 并设计出了适用于鲸类 SRY 基因的扩增引物^[27]。该引物能从座头鲸和其他 5 种鲸(2 种齿鲸, 2 种海豚和 1 种须鲸)已知雄性个体的基因组 DNA 中扩增得到预期的产物——SRY 片段, 而在相同条件下, 鲸类的雌性个体和人类却得不到该产物。因而在合适的 PCR 条件下用该引物进行性别鉴定能排除由于人类 DNA 的污染导致错误结论的可能性。Palsbø 11 等的结果表明 ZFX/ZFY 和 SRY 区域在鲸类性染色体上的存在性, Richard 等设计出的鲸类特异性引物预示了 PCR 技术在鲸类甚至其他哺乳动物的性别鉴定方面将有很好的应用前景。

1.5 DNA 序列分析用于鲸类的种类鉴定

以往对喙鲸科各种类的鉴定主要依据一些基本的形态特征, 如头的形状、骨骼的形态、牙齿的位置和形状等^[28, 29]。要得到肯定的结果则需要在实验室中对头骨进行仔细研究, 这一点在野外工作中通常是无法做到的, 因而常常会作出错误的判断。PCR 和 DNA 测序技术的发展和成熟使得从保存的一小块组织判断鲸类的种类成为可能。其中一个较为成功的事例是 Henshaw 等通过比较线粒体 DNA 控制区同源序列的碱基差异对加利福尼亚海域流刺网捕获的 12 头喙鲸进行种类鉴定^[30]。结果能肯定其中 6 头为剑吻鲸(*Ziphius cavirostris*)、2 头为扇齿喙鲸(*Mesoplodon stejnegeri*) 和扁齿喙鲸(*M. carlhubbsi*), 其余 4 头则不能确定。Henshaw 等确信只要能够收齐喙鲸科所有种类的线粒体控制区序列作为参照, 该方法可以鉴别出所有的喙鲸种类。利用线粒体 DNA 序列进行种类鉴定的基础是种内和种间同源序列的碱基差异, 而且 DNA 序列分析的结果在所有的分析方法中应该是最直接和最为可靠的。因此, 可以大胆地推测, 该方法在其他鲸类种群甚至其他哺乳动物的种类鉴定中将会有更多的应用。

2 分子生物学方法在江豚和白 豚物种保护中的应用展望

将分子生物学方法引进到鲸类学研究中的最终目的是对这些物种进行合理的管理和保护。特别是那些珍稀的濒临灭绝的或者种群数量下降很快的物种或种群, 如中国特有的小型齿鲸——白 豚和长江江豚。为了制订合理的管理和保护措施, 很有必要对它们的遗传状况, 如遗传变异(Genetic variation)、种群遗传结构(Genetic population structure)、基因流(Gene flow)等方面进行研究。分子生物学方法正是解决这些问题的有效途径。

2.1 种群遗传研究和分类

到目前为止, 白 豚数量已经不足 100 头, 长江江豚估计也不到 2000 头, 并且种群数量下降很快^[31]。大多数人认为人类活动是导致白 豚和长江江豚种群数量快速下降的主要因素。然而一个物种种群数量的下降除了客观存在的外部原因外, 必然有其固有的内在原因。如创立者效应

(Founder effect)^[2]、遗传漂变(Genetic drift)^[3]、近交衰退(Inbreeding decline)^[32]等, 因而很有必要对它们的遗传状况进行研究。目前, 用于研究种群遗传变异的方法很多, 但 DNA 序列分析是其中最直接最可靠的方法。在进行 DNA 序列分析时, 可以选择不同的基因。线粒体 DNA 控制区由于具有母性遗传、进化速度快等优点, 而成为研究物种及种下分类单元遗传变异和种群遗传结构的首选基因。因此, 可以从白 豚和长江江豚线粒体 DNA 控制区序列反映出的遗传变异状况入手, 分析它们是否存在上述导致物种种群数量下降的遗传因素, 并且可以推测其遗传背景。在进行白 豚和长江江豚遗传背景研究时, 存在一个很重要的问题是样品的采集及其数量受到限制。但 PCR 技术的诞生, 使得这个问题在一定程度上得到解决。因为通过 PCR 扩增可以从陈旧标本甚至福尔马林固定的组织样品中提取的微量 DNA 中得到某些基因片段^[33], 从而可以用于遗传变异分析。

关于江豚的分类, 有两种不同的观点。Pilleri 和 Gehr 根据不同产地江豚标本的形态差异, 将其分为三个种^[34]。而王丕烈和高安利等主要根据测量性状差异将江豚分为三个亚种^[35, 36]。他们的分类基础均是形态差异, 所以无法判断哪一种分类更加合理。然而, 物种分类最可靠的依据应该是它们自身的遗传物质。因此, 可以根据遗传变异对江豚进行分类。DNA 序列从遗传物质的一级结构反映遗传信息, 因而适合于遗传变异和种群结构分析。同时现阶段 DNA 测序技术已经得到突破, 使得 DNA 序列分析法可以成为江豚分类的有效途径。目前这方面的研究工作已经取得了一些进展^[5]。

2.2 用于研究基因交流和个体迁移

关于长江江豚与海生江豚之间是否有个体迁移这一问题一直存在争议。张先锋等根据长江干流中江豚种群数量在不同分布区域的季节性变化推测长江江豚可能在长江与东海之间或长江与其相通的湖泊(如鄱阳湖、洞庭湖)之间作长距离的迁移^[37]。杨光等运用线粒体 DNA 控制区序列分析中国水域江豚种群遗传变异时, 发现 3 个江豚群体之间存在显著的遗传分化, 认为它们之间不大可能发生海江或江海迁移并且缺乏基因交流^[1]。然而, 杨光等最近的研究则得到了与此截然相反的结论, 认为中国水域 3 个不同江豚种群之间可能存在基因交流和个体迁移^[5]。此外, 长江不同江段江豚群体之间是否形成生殖隔离也有待研究。该类问题的解决直接关系到该物种的保护和管理策略。解决这样的问题通常有两类方法: 最直接的方法是通过观察个体的运动计算迁移率; 间接的方法则是采用遗传学手段评估长期的基因流^[38]。但到目前为止还没有直接的野外观察资料可以为这一问题提供明确的答案, 而且开展这样的野外观察其难度也可想而知。相反, 分子生物学方法解决这样的问题似乎更方便快捷。例如, 可以通过线粒体 DNA 控制区序列分析确定不同的单倍型及其相互间的遗传距离, 并采用种群遗传学方法统计单倍型频率及其在不同群体中的分布, 再选择合适的遗传模式计算得到衡量基因流和个体迁移的参数。到目前为止, 已经有一些计算机软件可以用于这方面的数据分析,

如DnaSP。但利用线粒体DNA控制区序列来研究基因流和个体迁移也存在不足,例如线粒体DNA是核外遗传物质并且本身有母性遗传特性,所以只能检测到雌性个体迁移造成的基因交流,而无法判断核基因交流和雄性个体迁移引起的基因交流。微卫星分析可以弥补这方面的不足。选择合适的微卫星引物,通过PCR扩增可以从核基因组中得到该位点的等位基因。对多个微卫星位点的所有等位基因进行数量遗传学分析便可以得到衡量群体间基因交流的参数。

2.3 用于血亲关系鉴定和群体结构分析

鲸类的物种保护研究中有时需要对个体之间的血亲关系进行鉴定。例如,为了分析判断湖北石首天鹅洲白豚半自然保护区中建立和发展起来的长江江豚群体维持自身发展的能力,需要对其群体结构进行分析。在进行群体结构分析时,通常需要弄清楚个体之间的亲缘关系。由于江豚是群居性哺乳动物,通常集群活动,所以判断亲子关系将是一件非常不容易的工作。因为对于某一新生幼仔,虽然可以从某些行为(如驮仔、授乳等)判断母子关系^[39],但从理论上讲生活于同一群体中的所有性成熟雄性个体均可以是其父亲,即可能有多个潜在的父亲。DNA指纹技术具有准确、灵敏、稳定、重复性好等优点。此外,更为重要的是该遗传标记符合孟德尔遗传规律,即后代所拥有的所有条带可以与其双亲之一或同时找到。以上特点使得DNA指纹技术适合于个体识别、血亲关系鉴定和群体结构分析,因而可以成为解决江豚血亲关系问题有效的途径。

江豚是群居性动物,在长江中和围养条件下均有集群行为发生。围养条件下的观察结果表明江豚一般成双成对活动,大多是母子豚,也有成年雌雄豚相依的情况,这种成对的江豚构成群体的核心单元^[39]。因此,可以采用分子生物学方法并结合野外观察资料对保护区中江豚的群体结构和集群行为进行遗传学分析,例如分析其集群原则及遗传学机制。微卫星由于具有突变速率快、多态性高和共显性遗传等特点而成为此类研究的一种理想的遗传标记(Genetic mark)。扩增片段长度多态性分析(AFLP)是近年来出现的一种新的指纹图谱法^[40],能够产生数十条甚至上百条条带,并且符合孟德尔遗传规律,因此也可以成为分析群体结构的一种有效方法。

2.4 在保护区遗传管理中的应用

目前,白豚的种群数量可能不足100头,已经濒临灭绝的边缘。为了保存该物种,现在惟一的希望是把尽可能多的白豚集中到一个保护区内^[31]。即建立一个有效的繁殖群体,使之能够自然繁殖,从而达到保护的目的。这就很自然地涉及到保护区的遗传管理问题。保护区遗传管理的主要原则就是最大程度地保护动物天然的遗传多样性及其进化潜力。从这个原则出发,为了避免近亲繁殖引起遗传衰退,首先需要解决的问题就是确定最小有效种群数量。而有效种群数量的确定直接与杂合性(Heterozygosity)、等位基因(Alleles)数量以及性比(Sex ratio)等相关。DNA指纹图谱、微卫星等分子生物学方法可以很好地解决上述问题,因而将在

保护区的遗传管理决策中发挥重要作用。

分子生物学方法和技术已经成为鲸类进化生物学、保护遗传学、生态学等诸多领域非常重要的研究工具。相信随着分子生物学技术的发展和新技术的出现,它们在鲸类学研究中的应用将会越来越广泛。

参考文献:

- [1] Yang G, Zhou K Y. Population genetic variation of three populations of finless porpoises in Chinese waters [J]. *Acta Zoologica Sinica*, 1997, **43**(4): 411—419. [杨光, 周开亚. 中国水域江豚种群遗传变异的研究 [J]. 动物学报, 1997, **43**(4): 411—419]
- [2] Rosell P E, and Rojas Bracho L. Mitochondrial DNA variation in the critically endangered Vaquita *Phocoena sinus* Norris and Macfarland, 1958 [J]. *Mar. Mamm. Sci.*, 1999, **15**(4): 990—1003
- [3] Malik S, Brown M W, Kraus S D, et al. Analysis of mitochondrial DNA diversity within and between North and South Atlantic right whales [J]. *Mar. Mamm. Sci.*, 2000, **16**(3): 545—558
- [4] Dalebout M L, Hooker S K and Christensen I. Genetic diversity and population structure among northern bottlenose whales, *Hyperoodon ampullatus*, in the western North Atlantic Ocean [J]. *Can. J. Zool.*, 2001, **79**: 478—484
- [5] Yang G, Ren W H, Zhou K Y, et al. Population genetic structure of finless porpoise, *Neophocaena phocaenoides*, in Chinese waters, inferred from mitochondrial control region sequences [J]. *Mar. Mamm. Sci.*, 2002, **18**(2): 336—347
- [6] Arnason U, Gullberg A. Relationship of baleen whales established by cytochrome b gene sequence comparison [J]. *Nature*, 1994, **367**: 726—728
- [7] Milinkovitch M C. The phylogeny of whales: a molecular approach [J]. *Mol. Genet. Mar. Mamm.*, 1997, **3**: 317—338
- [8] Yang G, Zhou K Y, Ren W H, et al. Molecular systematics of river dolphins inferred from complete mitochondrial cytochrome B gene sequences [J]. *Mar. Mamm. Sci.*, 2002, **18**(1): 20—29
- [9] Carroll R L. Vertebrate Paleontology and Evolution [M]. New York: Freeman & Co. 1988
- [10] Gingerich P D, Simth B H, Simons E L. Hind limbs of Eocene *Basilosaurus*: Evidence of feet in whales [J]. *Science*, 1990, **249**: 154—157
- [11] Milinkovitch M C. DNA-DNA hybridizations support ungulate ancestry of Cetacea [J]. *J. Evol. Biol.*, 1992, **5**: 149—160
- [12] Milinkovitch M C, Guillermo O, Meyer A. Revised phylogeny of whales suggested by mitochondrial ribosomal DNA sequences [J]. *Nature*, 1993, **361**: 346—348
- [13] Rice D W. Marine Mammals of the World: Systematics and Distribution [M]. Lawrence, K. S: Society of Marine Mammals, 1998
- [14] Fordyce E R. Cetacean evolution and Eocene/Oligocene environments [A]. Porthero D R and Berggren W A. Eocene/Oligocene Climatic and Biotic Evolution [M]. Princeton, NJ: Princeton University Press, 1992
- [15] Nikaido M, Matsuno F, Hamilton H, et al. Retroposon analysis of major cetacean lineages: The monophyly of toothed whales and the par-

raphy of river dolphins [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001, **98**(13):7384—7389

[16] Cassens I, Vicario S, Waddell V G, *et al.* Independent adaptation to riverine habitats allowed survival of ancient cetacean lineages [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000, **97**(21): 11343—11347

[17] Jeffreys A J, Wilson V, Thein S L. Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA [J]. *Nature*, 1985, **314**: 67—73

[18] Hoelzel A R, Ford J K B, Dover G A. A paternity test case for the killer whale (*Orcinus Orca*) by DNA fingerprinting [J]. *Mar. Mamm. Sci.*, 1991, **7**(1):35—43

[19] Emlen S T, Oring L W. Ecology, sexual selection, and the evolution of mating systems [J]. *Scenae*, 1977, **197**: 215—223

[20] Clutton Brock T H. Female transfer and inbreeding avoidance in social mammals [J]. *Nature*, 1989, **337**: 70

[21] Amos B, Schlätterer C, Tautz D. Social structure of pilot whales revealed by analytical DNA profiling [J]. *Science*, 1993, **260**(30): 670—672

[22] Winn H E, Bischoff W L, Tanuski A G. Cytological sexing of cetaceans [J]. *Mar. Bio.*, 1973, **23**: 343—346

[23] Lambertsen R H, Baker C S, Duffield D A, *et al.* Cytogenetic determination of sex among individually identified humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) [J]. *Can. J. Zool.*, 1988, **66**: 1243—1248

[24] Schneider Gädicke A, Beer Romeo P, Brown L G, *et al.* ZFX has a gene structure similar to ZFY, the putative human sex determinant, and escapes X inactivation [J]. *Cdl*, 1989, **57**: 1247—1258

[25] Sinclair A H, Berta P, Palmer M S, *et al.* A gene from the human sex determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA binding motif [J]. *Nature*, 1990, **346**: 240—244

[26] Palsbøll P J, Vader A, Bakke I, *et al.* Determination of gender in cetaceans by the polymerase chain reaction [J]. *Can. J. Zool.*, 1992, **70**: 2166—2170

[27] Richard K R, McCarrey S W, and Wright J M. DNA sequence from the SRY gene of the sperm whale (*Physeter macrocephalus*) for use in molecular sexing [J]. *Can. J. Zool.*, 1994, **72**: 873—877

[28] Balcomb III K C. Baird's beaked whale, *Berardius bairdii* Stejneger, 1883: Amoux's beaked whale, *Berardius arnuxii* D'Orbigny, 1851 [A]. Ridgway S H, and Harrison R J. *Handbook of Marine Mammals* [C]. London: Academic Press. 1989

[29] Mead J G. Beaked whales of the genus *Mesoplodon* [A]. Ridgway S H and Harrison R J. *Handbook of Marine Mammals* Vol. 4[C]. London: Academic Press. 1989

[30] Hershaw M D, Leduc R G, Chivers S J, *et al.* Identifying beaked whales (Family Ziphiidae) using mtDNA sequences [J]. *Mar. Mamm. Sci.*, 1997, **13**(3):487—495

[31] Liu R J, Zhang X F, Wang D, *et al.* Once again studies on the conservation of *Lipotes vexillifer* and *Neophocaena phocaenoides* [J]. *Resources and Environment in the Yangtze Valley*, 1996, **5**(3): 220—225. [刘仁俊, 张先锋, 王丁, 等. 再论白豚和江豚的保护 [J]. 长江流域资源与环境, 1996, **5**(3): 220—225]

[32] Schaeff C M, Kraus S D, Brown M W, *et al.* Comparison of genetic variability of North and South Atlantic right whales (*Eubalaena*), using DNA fingerprinting [J]. *Can. J. Zool.*, 1997, **75**: 1073—1080

[33] Xu L X, Zhang Z B, Song M J, *et al.* A method of extract genomic DNA from animal specimen preserved in formalin [J]. *Acta Zoologica Sinica*, 2002, **48**(2): 264—269. [徐来祥, 张知彬, 宋铭晶, 等. 福尔马林保存的动物标本基因组 DNA 的提取方法 [J]. 动物学研究, 2002, **48**(2): 264—269]

[34] Pilleri G, and Gilhr M. On the taxonomy and ecology of finless black porpoise, *Neophocaena* (Cetacean, Delphinidae) [J]. *Mammalia*, 1975, **39**: 657—673

[35] Wang P L. The morphological characters and the problem of subspecies identifications of the finless porpoise [J]. *Fisheries Science*, 1992, (11): 4—9. [王丕烈. 江豚的形态特征和亚种划分问题 [J]. 水产科学, 1992, (11): 4—9]

[36] Gao A L, and 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 [J]. 兽类学报, 1995, **15**(2): 81—92]

[37] Zhang X F, Liu R J, Zhao Q Z, *et al.* The population status of finless porpoise in the middle and lower reach 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 [J]. 兽类学报, 1993, **13**(4): 260—270]

[38] Lande R. Applications of genetics to management and conservation of cetaceans [C]. *Rep. Int. Whal. Commn (special issue 13)*, 1991, 301—311

[39] Chen P X, Liu R J, Wang D, *et al.* *Biology, Rearing and Conservation of Baiji* [M]. Beijing: Sciences Press. 1997. [陈佩薰, 刘仁俊, 王丁, 等. 白豚生物学及饲养与保护 [M]. 北京: 科学出版社. 1997]

[40] Vos P, Hogers R, Bleeker M, *et al.* AFLP: a new technique for DNA fingerprinting [J]. *Nucleic Acids Res.*, 1995, **23**: 4407—4414