

鲸类微卫星引物对长江江豚的适用性研究

夏军红^{1,2} 郑劲松^{1,2} 王 丁

(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 100039)

摘要: 微卫星在长江江豚(*Neophocaena phocaenoides asiaorientalis*)中的应用研究还未见报道。本研究采用已发表的来自 6 个鲸种的 23 对微卫星引物对一个长江江豚群体 DNA 样本进行了微卫星扩增。结果表明其中有 7 对引物在此群体中的扩增产物是稳定且多态的, 序列分析结果表明这 7 对引物的扩增产物都具有 AC 或 GT 两碱基重复单元, 从而证明了扩增的有效性。研究结果表明用从其他鲸类分离出的微卫星引物可以快速筛选到适用于长江江豚指纹分析的引物。

关键词: 长江江豚; 微卫星; 筛选

中图分类号: Q959.8 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2004)06-0640-07

长江江豚(*Neophocaena phocaenoides asiaorientalis*)属于小型齿鲸, 主要分布在长江中下游干流、洞庭湖和鄱阳湖及其主要支流^[1], 是江豚的一个相对独立的淡水亚种^[2-3]。1978 到 1991 年生态考察结果表明长江江豚种群数量约为 2700 头^[1]。随后从 1991 到 1999 年的考察进一步说明长江江豚种群数量正在迅速下降^[4-5]。另外, 种群生存力分析(PVA)结果显示在目前情况下, 如不采取保护措施, 长江江豚将在 24—94a 内灭绝^[6], 现已被 IUCN 红色名录列为濒危等级^[7]。

遗传变异是物种适应环境变化的结果, 也是物种适应能力的体现, 对于一个物种的生存来说至关重要, 所以对遗传多样性的度量将影响到对濒危物种应该采取的保护措施的选择和实施。微卫星由于具有高突变率, 因而在许多物种中显示出高水平的遗传变异^[8], 已经成为非常有用的遗传标记而被广泛应用。然而到目前为止, 对长江江豚遗传变异的研究仅限于线粒体 DNA 水平^[9-10]。由于线粒体具有母性遗传的特性, 线粒体 DNA 序列分析不能反映核基因流的情况, 因而需要寻找像微卫星这样的双亲遗传标记。对于大多数物种而言, 应用微卫星标记首先必须分离出微卫星位点并设计 PCR 引物。传统的微卫星分离方法必须构建基因组文库, 费用

高、时间长而且效率低^[11], 限制了微卫星分子标记技术的应用和发展。1991 年, Schlötterer 等报道鲸类的微卫星末端序列是高度保守的, 自一个鲸种分离的微卫星引物可以应用到其他鲸类的分子分析中^[12]。随后, 在许多鲸类的遗传学研究中微卫星引物跨种扩增都取得了成功^[12-14], 显示鲸类微卫星引物跨种扩增是非常有效的。本研究应用从其他鲸类基因组分离的微卫星引物对湖北长江天鹅洲白豚(*Lipotes vexillifer*)国家级自然保护区的一个长江江豚群体样本进行了微卫星扩增, 以筛选合适的微卫星引物, 为今后进一步深入开展长江江豚遗传研究和遗传保护工作提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料 实验材料采用 2002 年 6 月取之于湖北长江天鹅洲白豚国家级自然保护区全部江豚个体的全血样本。在保护区共捕捉到全部 22 个个体, 视豚个体大小取 10—20mL 全血, ACD(acid-citrate-dextrose)抗凝, 液氮保存直到 DNA 提取。同时对人工饲养条件下的捕自该保护区的一雌豚进行取样, 共 23 份样本用于引物筛选研究。

1.2 DNA 提取 应用 DNA 抽提试剂盒 E. Z. N. A Blood DNA kits(Omega Bio-tek Inc.)从 ACD 抗凝的

收稿日期: 2003-10-13; 修订日期: 2003-11-18

基金项目: 国家自然科学基金(30170142); 中国科学院重要创新方向项目(KSCX2-SW-118); 中国科学院创新领域前沿项目(220103)资助

作者简介: 夏军红(1975—)男, 湖南常德人; 博士生; 从事鲸类保护遗传学研究

通讯作者: 王 丁, E-mail: wangd@ihb.ac.cn

全血中提取基因组 DNA, 操作按试剂盒说明书进行。得到的 DNA 重悬于 TE 缓冲液(10mmol/L Tris, 0.1mmol/L EDTA, pH 8.0)中, 作为 PCR 扩增模板。

1.3 引物选择与来源 共选择 23 对微卫星座位的引物(表 1)基于它们在分离群体中的多态性水平及扩增效果对长江江豚基因组 DNA 进行了 PCR 扩增。所有引物均由上海博亚生物技术有限公司合成, PAGE 胶纯化。

表 1 实验所用微卫星引物	
Tab. 1 The microsatellite primers used in this study	
种类 Species	微卫星座位 Microsatellite locus
鼠海豚 <i>Phocaena phocaena</i>	PPH0110、PPH0133、PPH0142、PPH0137 ^[15]
北露脊鲸 <i>Eubalaena glacialis</i>	rw34、rw26、rw217、rw31、rw48、rw25、rw219 ^[13]
抹香鲸 <i>Physeter catodon</i>	EV10pm ^[16] 、JB651、JB64、JB69 ^[17]
座头鲸 <i>Megaptera novaeangliae</i>	GT271、GT575、GT023 ^[18]
宽吻海豚 <i>Tursiops truncatus</i>	Texvet3 ^[19]
长肢领航鲸 <i>Globicephala melas</i>	409/470、415/416、464/465、468/469 ^[20]

1.4 PCR 扩增与检测 PCR 扩增所用仪器为 PTC-100™ Programmable Thermal Controller (MJ Research Inc.)。反应体系如下: 其中 DNA 模板 4μL; 每种引物浓度为 1μmol/L; [Mg²⁺] 为 1.7μmol/L; [dNTPs] 0.16μmol/L; 1U Taq DNA 多聚酶(Sangon 公司); 1× PCR Buffer; 补充双蒸水至终体积 25μL。PCR 热循环程序如下: 首先 95℃变性 2min, 接着 95℃变性 1min, 65℃退火 1min, 然后 72℃延伸 1min, 每循环温度降低 1℃直至该引物退火温度, 接着在此退火温度下继续循环 30 次, 最后 72℃充分延伸 5min。引物退火温度见表 2。

PCR 产物采用 DYY II20B DNA 序列分析电泳槽(凝胶面积: 470×170mm, 北京市六一仪器厂), 通过 6.0% 变性聚丙烯酰胺凝胶(PAGE)电泳分离, 银染技术检测(Promega 公司产品说明书)。应用软件 Labimage(ver2.6, by Kapelan, <http://www.labimage.de>)相对于分子量标记 PBR322/MspI markers(华美生物工程公司)确定等位基因大小。每个微卫星标记至少被重扩一次以保证结果的准确性。

1.5 PCR 产物回收、克隆与测序 为了检验筛选得到的微卫星引物在长江江豚群体中的 PCR 扩增产物中是否含有微卫星重复序列, 每对引物的 PCR 扩增产物经 PAGE 胶分离后, 用刀片挖一目的片段(其中的一个等位基因片段), 然后采用 TE(10mmol/L Tris, 0.1mmol/L EDTA, pH 8.0)浸泡, 65℃水浴约

表 2 保护区群体微卫星分析统计表
Tab. 2 Summary of statistics for the reserve population with microsatellite analysis

Locus	K	Ho	He	HW	T
PPH0137	6	0.9444	0.8365	NS	57℃
PPH0110	7	0.9565	0.8541	NS	50℃
PPH0142	4	0.6522	0.5729	NS	59℃
GT271	3	0.4348	0.5179	NS	59℃
GT575	2	0.0435	0.4145	**	60℃
rw34	6	0.4348	0.4995	NS	59℃
EV10pm	3	0.3000	0.3090	NS	49℃

K 为每微卫星座位在群体中检测到的等位基因数, Ho 观察杂合度, He 期望杂合度, HW Hardy-Weinberg 平衡检验, T 引物退火温度。偏离 HW 平衡以星号显示, NS 代表非显著水平; ** $P < 0.01$

For each locus in the population the observed number of alleles (K), the observed (Ho) and expected (He) heterozygosity, test for Hardy-Weinberg equilibrium (HW), and the annealing temperature (T) for PCR are reported. The departure from Hardy-Weinberg equilibrium is indicated by asterisks, NS, not significant; “**” $P < 0.01$

30min, 离心取上清液作为 DNA 扩增模板。用相应的微卫星引物进行二次 PCR 扩增。产物纯化采用 UltraPure™ PCR 产物纯化试剂盒(北京赛百盛基因技术有限公司)。pGEM-T 载体(北京赛百盛基因技术有限公司)克隆、转化。所有操作均按说明书进行。克隆片段测序反应由上海博亚生物有限公司采用 ABI PRISM™ (Model 377, version 3.2)完成。

1.6 数据分析 等位基因杂合度观察值及期望值(The observed heterozygosity; Ho, and expected heterozygosity, He)以及 Hardy-Weinberg 平衡检测等通过程序 POPGENE(ver1.3.1)^[21]完成。

1.7 序列分析 依据参考文献中提供的微卫星序列号从 GenBank 中得到原始序列。通过 ClustalX(ver 1.8)^[22]程序将克隆测序得到的核酸序列与其相应的微卫星原始序列进行排列比较, 并利用程序 DnaSP(ver 3.51)^[23]进行核苷酸多样性分析。

2 结果

2.1 微卫星引物筛选

本研究共采用了从 6 个鲸种基因组分离的 23 对微卫星引物(表 1)对天鹅洲保护区的长江江豚群体样本进行了 PCR 扩增。最终有 7 对微卫星座位(PPH0137、PPH0110、PPH0142、GT271、GT575、rw34、EV10pm)引物在群体中的扩增产物是稳定且多态的。每个微卫星座位在群体中检测到 2 个到 7 个不

等的等位基因, 平均为 4.4 个, 遗传杂合度水平最低的为座位 GT575($H_o = 0.0435$), 最高的为 PPH0110 ($H_o = 0.9565$)。除微卫星座位 GT575 外, 其余 6 个座位的等位基因频率在群体中的分布都符合 Hardy-Weinberg 平衡(表 2)。其中有 3 对微卫星座位 (PPH0137、PPH0110 及 PPH0142) 分离自鼠海豚两对 (GT271 和 GT575) 分离自座头鲸, 另外两对 (rw34 和 EV10pm) 分别来自于北露脊鲸和抹香鲸。来自宽吻海豚和长肢领航鲸的微卫星引物在保护区群体中没有检测到多态性。

除了微卫星座位 GT575 外, 其余 6 个座位的引物 PCR 扩增产物在 PAGE 胶上分离时显示较强 *sutter bands*。EV 10pm 和 PPH0137 的扩增产物除目的片段外总存在一些可重复扩增的产物, 可能反映出这两个微卫星座位的引物在长江江豚基因组上具有多个结合位点。

另外有 5 个微卫星座位 (JB64、JB69、rw25、415/416 及 468/469) 的引物在长江江豚群体中 PCR 扩增产物较为稳定, 在 PAGE 胶中分离时具有一条较强的主带, 然而在群体中没有多态性, 其余引物的扩增产物稳定性较差, 缺乏主带, 因此在进一步的测序研究中均被剔除。

采用的 23 对微卫星引物在群体分析中能够得到相对稳定扩增产物的有 12 对, 占采用引物的 52.2%。其中, 扩增产物在群体中分离具有多态性的有 7 对, 占 30.4%。12 对可扩增引物中有 8 对分

离自齿鲸亚目的鲸种, 占采用的齿鲸引物的 62%, 扩增产物具有多态性的齿鲸引物比例为 30.8%。另有 4 对可扩增微卫星引物分离自须鲸亚目, 占采用的须鲸引物的 40%, 具有多态性的须鲸引物比例为 30%。而就种而言, 齿鲸亚目的鼠海豚、抹香鲸、长肢领航鲸、宽吻海豚的可扩增引物比例分别为 75%、75%、50%、0; 须鲸亚目中座头鲸及北露脊鲸的可扩增引物分别为 66.7%、28.5%。相比较而言, 齿鲸鼠海豚和抹香鲸的可扩增引物比例最高, 宽吻海豚最低。

2.2 测序鉴定

对以上筛选得到的 7 对微卫星引物的扩增产物进行克隆测序鉴定, 并对测序结果进行了序列分析, 发现每一目的片段均含有 GT 或 AC 两碱基重复核心序列(表 3)。对扩增产物侧翼序列与相应微卫星座位的原始发表序列进行了比较, 发现在不考虑微卫星重复核心序列的情况下, 来源于须鲸亚目的三个微卫星座位 (rw34、GT271、GT575) 的 PCR 引物在群体中的扩增产物侧翼序列与原始序列间的碱基差异即核酸多样性(π)较大, 位于前三位, 其余序列间的碱基变异较小 (PPH0137、PPH0110), 或完全没有变异 (PPH0142、EV10pm)。将七条微卫星扩增产物侧翼序列合并后与相应的原始发表序列相比, 其序列差异(π)为 0.06061。由于 rw34 原始发表序列末端区具有多个未知位点(N), 当排除此序列后序列差异(π)为 0.03529。具体分析结果见表 4。

表 3 微卫星引物扩增序列与其原始序列的比较
Tab 3 Comparison between amplified sequence for each primer pairs and its original sequence that the primers come from

座位 Locus	种类 Species	扩增序列(5' → 3') Amplified sequence
PPH0110	FI	(AC-CACACACACACACACACACACACACACAC) GTCAATGTGTGCAAGAAATGG
	HA	(*A*****) *****A*****
	FI	TGAAGACGGAAT
	HA	*****
PPH0137	FI	CAGGTTGTGCACTGTTCTGCCAG (CACACACACACACACACACACACACACGCGAC
	HA	*****T***** (*****A**
	FI	ACACA--) GG
	HA	*****CA) **
PPH0142	FI	CCGACCTCGAGGATACCGAGGGGTGTGCATCAGCCGAAATAACACACACGCGCCGAG (A
	HA	***** (*
	FI	C-----ACACACACACACACAC) CGTTTGACAGTTCCT

			续表
座位	种类	扩增序列(5' →3')	
Locus	Species	Amplified sequence	
GT575	HA	*ACACACACACACACACACAC*****) *****	
	FI	TTTTAAAACTGAAAAACAGTTTATAGAGCAAATAAGTAAGAA (GTGTGTGTGTGTTG	
	HU	*****[***** (*****-----*	
	FI	TGTGTGTGTCTGTGTGTGTGTGTGTGT) TGACAAGAACAATACTGAAAAATAT	
GT271	HU	*****G*****) **T*****T*****	
	FI	AGCACCCAAATGACCAAGAAGCAAAC— (-----GTG—TGTGTGTGTGT	
	HU	*A*****A**A*AT (GTGTGTGTGTGT**TG*****	
	FI	GTGTGTGTGT	
rw34	HU	*****	
	FI	ACACACACACACACACACACGCACACACACGCACACACACACA) CCTCAATTAT	
	RI	*****A*****A*****) GNA**G*NGN	
	FI	ATAAG	
EV10pm	RI	NCGT*	
	FI	GG (-----TGTGTGTGTGAGTGTGT	
	SP	** (TGTGTGTGTGTGTGTGCGTGTGTGTGCGTGTGTG*****T*****	
	FI	GTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTAT) TGGTTATGGGCTGTTGGTTTCT	
	SP	***** *) *****	

FI 代表长江江豚;HA 鼠海豚;HU 座头鲸;RI 北露脊鲸;SP 抹香鲸;* 代表两序列在此位点的碱基无变异;括号内为核心序列
FI represents the Yangtze finless porpoise; HA the harbour porpoise; HU the humpback whale; RI the North Atlantic right whale; SP the sperm whale; * indicates no nucleotide variation in this site between two sequences; Core sequence is included in parentheses

表 4 微卫星引物扩增序列与其原始序列的核苷酸多样性分析
Tab.4 Nucleotide diversity analysis between amplified sequence for each primer pairs and its original sequence that the primers come from

座位	位点数 ^(a)	多态性位点数	N 核酸多样性(π)
Locus	Site number	Polymorphic site number	Nucleotide diversity
PPH0110	33	1	0.03030
PPH0137	26	1	0.03846
PPH0142	74	0	0.00000
GT271	29	3	0.11111
GT575	69	4	0.05797
rw34	11 ^(b)	7	0.63636
EV10pm	24	0	0.00000
Tatal ^(c)	266	16	0.06061

(a) 排除了微卫星重复序列后的位点数; (b) 北露脊鲸座位 rw34 侧翼序列中含多个未知位点(以“N”表示), 在进一步分析中这些位点不予考虑; (c) 指将七个微卫星产物侧翼序列合并后的分析结果

(a) The number of sites does not include microsatellite repeat sequences; (b) Several sites (indicated as “N”) are unknown in the locus rw34 tandem sequence of the North Atlantic right whale, and are not considered in the further analysis; (c) The analysis result was obtained after combined the seven tandem sequences

3 讨论

微卫星分子标记技术已经应用到鲸类研究的许多领域, 如社群结构^[20]、群体血缘关系^[24]、个体识别^[25]、遗传结构和多样性分析^[26]、亲本相似性和繁

殖成功率之间的关系^[27]、雄性联盟成员与血缘关系^[28]以及遗传瓶颈分析^[29]等。然而, 迄今为止, 除 mtDNA 测序^[8-9]外, 其余关于长江江豚分子水平的研究报道非常少, 微卫星座位在该物种中的应用研究还未见报道。本研究选用的 23 对微卫星引物来

自鲸类的两个亚目(须鲸亚目和齿鲸亚目)的6个种(鼠海豚、座头鲸、北露脊鲸、抹香鲸、宽吻海豚和长肢领航鲸),其中12对微卫星引物在长江江豚群体中得到了相对稳定的PCR扩增产物,而其中只有7对扩增产物在群体中分离时显示出多态性。所采用的微卫星引物在群体中的平均可扩增比例为52.2%,扩增产物表现出多态性的引物比例为30.4%。Waldick等采用分离自北露脊鲸的7对微卫星引物对7个白鲸(*Delphinapterus leucas*)样本进行了PCR扩增,所有引物在群体中都得到了稳定的扩增产物,其中四个微卫星座位显示出较高水平多态性^[13]。Escorzar Trevino和Dizon用在其他的鲸类研究中显示出高水平多态性的7对微卫星引物对119个白腰鼠海豚(*Phocoenoides dalli*)样本进行了群体遗传结构分析。每个微卫星座位在群体中分别检测到17到32个等位基因,结果显示所有选用的微卫星座位在群体中都有高水平的多态性^[14]。与前人报道结果相比,本研究所采用的微卫星引物在长江江豚群体中的可扩增比例及扩增产物的多态性水平相对较低。一方面的原因可能与保护区群体自身遗传多样性水平非常低有关。夏军红等对保护区长江江豚群体进行了遗传多样性研究,发现在930bp的线粒体DNA控制区序列中仅发现两个变异位点,定义三种线粒体DNA单倍型。保护区江豚群体核苷酸多样性水平($\pi = 0.0007$)比长江种群($\pi = 0.00133$)低得多,显示了保护区江豚群体具特别低的遗传多样性水平,并且也反映了江豚这一物种整体低水平遗传多样性的特征(手稿,待发表),从而决定了微卫星引物筛选研究工作具有一定的难度。另一方面也可能是由于长江江豚与其他鲸类的微卫星末端碱基序列差异导致了引物结合位点的改变,从而最终导致PCR扩增失效。此外,该研究群体中江豚个体数量较少也给微卫星引物的筛选工作增加了一定的难度,因为很难保证从23个个体中检测到多个等位基因。

Schlötterer等应用从长肢领航鲸中分离得到的4个微卫星标记(415/416、464/465、199/200、417/418)从所研究的鲸种包括须鲸和齿鲸中都得到了PCR扩增产物。产物序列分析发现齿鲸与须鲸间微卫星末端区序列差异平均仅为3.2%,代表了中性核苷酸位点最低的遗传变异率,研究显示鲸类微卫星具有不寻常的高度保守的末端区序列^[12]。本实验中采用的7对微卫星引物的PCR扩增产物经测序鉴定都含有GT或AC两碱基重复核心序列,研究结果

说明应用其他鲸类的微卫星引物对长江江豚进行PCR扩增能够得到有效的扩增产物。其中须鲸亚目中的三对引物在长江江豚中的PCR扩增产物微卫星侧翼序列与原始发表序列的碱基差异(π)都大于3.2%,而齿鲸亚目的微卫星引物除PPH0137的PCR扩增产物微卫星侧翼序列与原始发表序列的碱基差异(π)稍大于3.2%外,其余仅具少数碱基的变异(PPH0110),或完全没有变异(PPH0142、EV10pm)。然而所有7个微卫星侧翼序列合并后的序列与相应合并的原始序列的碱基差异为0.06061,远大于齿鲸与须鲸间的平均序列差异^[12]。推测可能与微卫星座位rw34原始序列的测序效果有关,因为前人发表的原始侧翼序列含有多个未知位点,当排除此序列后两序列碱基差异仅为0.03529,接近齿鲸与须鲸间平均0.032的序列差异,数据说明长江江豚与其他鲸类微卫星两端非编码区序列间的碱基差异是非常小的。所以本研究也反映出Schlötterer等报道的鲸类不同科属间的某些微卫星座位具有高度保守的末端区,从而保证了较为特异性的种间扩增的类似结果^[12]。实验说明应用从其他鲸类分离的微卫星引物可以快速筛选到适用于长江江豚指纹分析的微卫星引物。

比较而言,须鲸亚目的三个微卫星座位(rw34、GT271、GT575)的引物在长江江豚中的PCR扩增产物的微卫星侧翼序列与原始发表序列之间的碱基差异都要大于齿鲸的。同时分析也发现采用的来源于齿鲸亚目的微卫星引物在群体中的可扩增引物比例为62%,而须鲸亚目的仅为40%,说明所采用的齿鲸亚目的微卫星引物在江豚群体中的可扩增比例要比须鲸亚目的高得多。并且所采用的齿鲸亚目中的鼠海豚和抹香鲸的微卫星引物的可扩增比例都为75%,代表了六个种中最高的可扩增引物比例。由于长江江豚属于齿鲸亚目、鼠海豚科,以上研究结果表明鲸类的微卫星引物跨种扩增与物种之间的亲缘程度有一定关系。因此,选择从近缘种分离的微卫星引物对长江江豚进行微卫星引物筛选将会增加得到有效引物的可能性。然而结果也发现,相对于其他种包括须鲸的两个种而言,采用的齿鲸亚目中的宽吻海豚的微卫星引物在群体中的可扩增比例是最低的。估计与实验中只选择了一个宽吻海豚的微卫星引物用于分析有关,如采用来自该鲸种更多的微卫星引物,可扩增引物比例应该会适当提高。

致谢:长江天鹅洲白豚国家级自然保护区管理处对本工作给予了大力支持,捕豚及资料整理过

程中得到本所鲸类保护生物学学科组张先锋、赵庆中、魏卓、王克雄、王小强、陈道权、龚伟民、匡新安等老师的帮助和指导, 在此表示感谢!

参考文献:

- [1] Zhang X F, Lin R J, Zhao Q Z, *et al.* The population of finless porpoise in the middle and lower reaches of 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]
- [2] Wang P L. On the taxonomy of the finless porpoise in China[J]. *Fishes Science*, 1992, **11**(6): 10—14[王丕烈. 中国江豚的分类. 水产科学, 1992, **11**(6): 10—14]
- [3] 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): 1—92]
- [4] Wang D, Liu R, Zhang X, *et al.* Status and conservation of the Yangtze finless porpoise. Reeves R R, Smith B D, Kasuya T. Biology and Conservation of Freshwater Cetaceans in Asia [C]. Occas. Pap. IUCN Spec. Surv. Comm., 2000, **23**, 81—85
- [5] Wei Z, Wang D, Zhang X F, *et al.* Population size, behaviour, movement pattern and protection of Yangtze finless porpoise at Ba Li Jiang section of the Yangtze river [J]. *Resources and Environment in the Yangtze Basin*, 2002, **11**(5): 427—432[魏卓, 王丁, 张先锋, 等. 长江八里江江段江豚种群数量、行为及其活动规律与保护. 长江流域资源与环境, 2002, **11**(5): 427—432]
- [6] 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]
- [7] Hilton-Taylor C. IUCN Red list of Threatened Species [C]. Gland: IUCN—The World Conservation Union, 2000
- [8] Dietrich W, Katz H, Lincoln S E. A genetic map of the mouse suitable for typing intraspecific crosses [J]. *Genetics*, 1992, **131**: 423—447
- [9] Yang G, Zhou K Y. Variability of the mitochondrial control region in population of finless porpoise, *Neophocaena phocaenoides*, 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. 动物学报, 1997, **43**(4): 411—419]
- [10] Yang G, Zhou K, Ren W, *et al.* Population genetic structure of finless porpoises, *Neophocaena phocaenoides*, in Chinese waters inferred from mitochondrial control region sequences [J]. *Mar. Mammal. Sci.*, 2002, **18**(2): 336—347
- [11] Zane L, Bargelloni L, Patamello T. Invited review: Strategies for microsatellite isolation: a review [J]. *Mol. Ecol.*, 2002, **11**: 1—16
- [12] Schlotterer C, Amos B, Tautz D. Conservation of polymorphic simple sequence loci in cetacean species [J]. *Nature*, 1991, **354**: 63—65
- [13] Waldick R C, Brown M W, White B N. Characterization and isolation of microsatellite loci from the endangered North Atlantic right whale [J]. *Mol. Ecol.*, 1999, **8**: 1753—1768
- [14] Escorza Trevino 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]. *Mol. Ecol.*, 2000, **9**: 1049—1060
- [15] 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 mt and nuclear markers [J]. *Mol. Ecol.*, 1999, **8**: 841—854
- [16] Valsecchi E. Cetacean microsatellites. In Genebank (accession number: G27347) 1996
- [17] Bond J M, Amos B. Sperm whale microsatellite loci. In Genebank (accession number: AF123274, AF123270, AF123269) 1999
- [18] Martine B, Hanne J, Ross M, *et al.* Polymorphic microsatellite loci isolated from the humpback whale, *Megaptera novaeangliae* [J]. *Mol. Ecol.*, 2000, **9**: 2155—2234
- [19] Rooney A P, Merritt D B, Derr J N. Microsatellite diversity in captive bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) [J]. *J. Hered.*, 1999, **90**(1): 228—230
- [20] Amos B, Schlotterer C, Tautz D. Social structure of pilot whales revealed by analytical DNA profiling. *Science*, 1993, **260**: 670—672
- [21] Yeh, Francis C, Yang R C, *et al.* POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis [P]. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Canada. 1997
- [22] Jeffs P. Multiple sequence alignment with Clustal X [J]. *Computer Corner*. 1998, **23**: 78—80
- [23] Rozas J, Rozas R. DnaSP version 3: an integrated program for molecular population genetics and molecular evolution analysis [J]. *Bioinformatics*, 1999, **5**: 174—175
- [24] Richard K R, Dillon M C, Whitehead H, *et al.* Patterns of kinship in groups of free living sperm whales (*Physeter macrocephalus*) revealed by multiple molecular genetic analyses [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, **93**(16): 8792—8795
- [25] Palsboll P J, Allen J, Berube M, *et al.* Genetic tagging of humpback whales [J]. *Nature*, 1997, **388**(6644): 767—769
- [26] Valsecchi E, Palsboll P, Hale P, *et al.* Microsatellite genetic distances between oceanic populations of the humpback whale (*Megaptera novaeangliae*) [J]. *Mol. Biol. Evol.*, 1997, **14**(4): 355—362
- [27] Amos W, Wilmer J W, Fullard K, *et al.* The influence of parental relatedness on reproductive success [J]. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B.*, 2001, **268**: 2021—2027
- [28] Möller L M, Beheregaray L B, Harcourt R G, *et al.* Alliance membership and kinship in wild male bottlenose dolphins (*Tursiops aduncus*) of southeastern Australia [J]. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B.*, 2001, **268**: 1941—1947
- [29] Waldick R C, Kraus S, Brown M, *et al.* Evaluating the effects of historic bottleneck events: an assessment of microsatellite variability in the endangered North Atlantic right whale [J]. *Mol. Ecol.*, 2002, **11**(11): 2241—2249

APPLICABILITY OF CETACEAN MICROSATELLITE PRIMERS IN THE YANGTZE
FINLESS PORPOISE

XIA JunHong^{1,2}, ZHENG Jir Song^{1,2} and WANG Ding¹

(1. Institute of Hydrobiology, the Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072;

2. Graduate school of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039)

Abstract: Application of microsatellites in the Yangtze finless porpoise (*Neophocaena phocaenoides asiaeorientalis*) has not been reported. In this study amplification of microsatellites were performed in DNA samples of the Yangtze finless porpoise population by PCR using twenty-three published microsatellite primers from *Phocaena phocaena*, *Eubalaena glacialis*, *Physeter catodon*, *Megaptera novaeangliae*, *Tursiops truncatus*, *Globicephala melas*. The results indicated seven primer pairs produced stable and polymorphic PCR products in the population. Further sequencing analysis showed that the amplified product sequences of the seven primer pairs all own AC or GT dinucleotide repeats, which confirmed that the amplification was valid. The results suggest that applicable primers in fingerprinting analysis of the Yangtze finless porpoise could be obtained faster by screening of microsatellite primers isolated from other cetacean species.

Key words: The Yangtze finless porpoise; Microsatellite; Screening