分子生态学研究与动物多样性保护

杨玉慧 李义明*

(中国科学院动物研究所, 北京 100080)

摘要: 分子生态学的发展揭开了生物多样性保护研究的新篇章。分子技术的应用克服了传统生态学方法中的一些难题,如野外调查周期长、分辨率有限、实验条件不易控制等。应用各种分子标记(如:RFLP、VNTR、RAPD、DNA测序等)可以分析种群地理格局和异质种群动态、确定种群间的基因流、研究瓶颈效应对种群的影响以及确定个体间的亲缘关系等等。所有这些研究都是指导物种保护和濒危种群的恢复所必需的。种或品系特异性的分子标记技术能够解决形态分类中的模糊现象,确定基于遗传物质的谱系关系,还可以用来分析近缘种间杂交问题。这些问题的解决有助于确定物种优先保护顺序,选择保护地区。近年来引起重视的主要组织相容性复合体(MHC)DNA变异分析可能会在研究种群对疾病的易感性等一系列种群特异性问题方面非常有用。随着分子技术的不断发展,会有更多的保护生物学问题得到解决,尤其是结合野外调查统计数据应用多个分子标记对目标种群进行研究,所得到的结果会更精确,更有说服力。

关键词: 分子生态学, 生物多样性, 保护生物学, 种群保护和恢复, 物种多样性

中图分类号: Q16, Q7 文献标识码: B 文章编号: 1005-0094(2001)03-0284-10

Molecular ecology and animal biodiversity conservation

YANG Yu-Hui, LI Yi-Ming*

Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080

Abstract: Recent advances in molecular ecology opened a new chapter in conservation biology study. Disadvantages such as the long-duration of field studies, limited resolution and difficulties in the control of experimental conditions in traditional ecology research are seen to be overcome by molecular ecology methods. Molecular markers (RFLP, VNTR, RAPD, mitochondrial DNA, etc.) provide efficient tools for the analyses of phylogeographic patterns, metapopulation dynamics, gene flow, population bottleneck effects and individual relatedness. All of these are very important for biodiversity conservation and restoration of declining species. Species or race specific molecular markers could help to clarify ambiguity in morphological classification, phylogenetic relationships and possible hybridization among closely related taxa. This would be useful for defining the priority in species protection and the selection of protected areas. Recently, genomic regions encoding the major histocompatibility complex (MHC) were used to evaluate various specific questions such as population susceptibility to diseases and appear promising for future analysis. The continuing development of molecular technology will further enhance conservation ecology study. Studies based on multiple molecular marker systems when combined with ecological, demographic, behavioral and physiological data collected in the field, would provide a more definitive assessment of various conservation issues.

Key words: molecular ecology, biodiversity, conservation biology, population conservation and restoration, species diversity

1 引言

传统生态学方法是用个体的历史记录描述种

群,这种方法容易得到数据。但当需精确估计个体繁殖成功率、种群扩散格局、种群(或亚种群)间基因流等问题时,这些方法就显得不足(Parker et al.,

基金项目: 本文受国家重点基础发展规划项目(G2000046805)、知识创新项目(C2999083)和国家基金委项目(39893360)资助。

收稿日期: 2000-10-30; 修改稿收到日期: 2001-03-09

作者简介: 杨玉慧,女,1976年出生,硕士研究生,主要研究方向为分子生态学。

* 通讯作者 Author for correspondence: 李义明。E-mail 地址: liym@panda.ioz.ac.cn

1998 ;Haig ,1998) ,主要是野外研究难度大 ,不容易控制整个试验。物种繁殖成功率在不同程度上反映了种群适应不同生态环境的能力 ,而精确地估计有效种群大小是保护生物学中的一个重要问题。繁殖率和基因流对种群内及种群间等位基因的贡献直接影响到种群的存活(Parker et al. ,1998) ,为解决这些野外生态学无法解决的问题 ,分子标记被引入动物种群研究中。在动物种群研究中应用的分子标记主要有如下几类 :蛋白质电泳 ,核 DNA 和线粒体 DNA 的限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism ,RFLP) ,小卫星及微卫星(minisatellite and microsatellite DNA)多态性 ,随机引物扩增的多态性 DNA(random amplified polymorphic DNA ,RAPD)和 DNA 序列分析等技术。本文主要综述分子技术在动物种群分析和物种或亚种的鉴定等方面的应用 ,分子标记在动物种群保护研究中所解决的问题及其意义。

2 分子标记在种群分析中的应用

种群生存力受确定性的因素和随机性的因素的综合影响。通常 ,当物种经受某种确定性的因素(如过度狩猎)的影响导致种群数量大大降低以后 ,随机性的因素对其命运的影响会大大增强。随机性因素可分为种群统计随机性、环境随机性、灾害随机性和遗传随机因素。应用分子标记技术 ,我们可以分析遗传随机因素对种群存活的影响 ,以便采取保护措施把种群内及种群间的遗传多样性保持在保护目标允许的范围内。在栖息地破坏非常严重以致于短期存活都成问题的种群中 ,提高种群的遗传多样性尤为重要(Haig ,1998)。分子工具可以用来推测种群的遗传多样性、种群间遗传关系和种群进化历史中的生态背景等。它们在种群分析中的应用分以下几点 :

2.1 物种的地理分布格局研究

了解分布不连续的种群间的遗传关系对推测种群的地理分布历史非常有用。物种的扩散受地理环境因素影响 ,其分布是不连续的 ,形成了一定的地理分布格局。由于物种形成于不同时期 ,地理隔离的形成和消失又在不断变化 ,并且同样的阻隔对不同的物种所起的作用不同 ,物种的种群地理分布格局因而可显示出多样性。有些种群的地理分布格局是长期稳定和连续的 ;有的则在生物进化过程中不断

出现大幅度的种群波动 ,例如由配子或克隆物种形成的只能存活几代的暂时小种群 ,由于气候变化或障碍消失而造成的大范围扩展的种群等(Slantkin ,1987)。

最近 ,借助分子标记技术的一系列研究 ,如对哺乳动物(Gavin et al. ,1999 ;Scandura et al. ,1998 ;Boyce et al. ,1999 ;Fedorov et al. ,1999)、鸟类(Bensch & Hasselquist ,1999)、两栖爬行类(Matsui et al. ,1998 ;Weisrock et al. ,1998 ;Grobler & Matlala ,1998 ;Paul ,1999a)、鱼类(Dergam et al. ,1998 ;Barinova et al. ,1998 ;Hara et al. ,1998 ;Bremer et al. ,1998 ;Bernardi & Crane ,1999 ;Waters & Burrige ,1999 ;Garcia-Marin et al. 1999)等的研究结果都表明种群地理分布格局同地理隔离存在相关性 ,地理种群间存在明显遗传差异。距离隔离或地理条件造成的隔离 ,使地理种群间基因流受到限制 ,促进了地理种群间遗传的差异形成。隔离的小种群容易受遗传漂变的影响 ,更容易灭绝(Gavin et al. ,1999 ;Hanski et al. ,2000)。人为活动造成的动物栖息地片段化也会使分布于不同栖息地碎片上的种群因缺乏基因交流表现出遗传差异。地理种群间以及它们与生境的关系对于物种保护和恢复极为重要。通过分子标记能了解地理种群间的遗传多样性差异和种群地理分布格局 ,推测它们的基因流和种群动态 ,从而为动物种群管理提供理论依据 ,对研究广布种和稀有种的生态适应性、存活机制和成因有着重要意义。Rabinowitz et al. (1986)从地理范围、生境专一性、局部种群大小三个方面把物种分为 8 类 ,其中稀有种就占 7 类。近来的研究表明稀有种的概念远比红皮书中所描述的复杂 ,对不同的稀有种采取的保护措施不同(Rabinowitz et al. ,1986)。例如 :对地理分布狭窄、生境专一的大种群管理可能集中在保护该物种生活的特有生境 ,对这样的种群则要求考虑将这些物种引回其他适宜生境 ;对地理分布广、生境专一的小种群当务之急是采取措施防止种群衰退 ,而生境非专一性的稀有物种 ,只有在面临广泛的生境破坏时才可能面临濒危状态 ,因此优先关注的水平可相对低一些。

确定种内进化保护单元是优化和实施保护策略的基础。澄清生物管理单元(management units ,MUs)和进化显著单元(evolutionarily significant units ,ESUs)概念为种内基本保护单元的确定提供

了非常有用的标准(Moritz ,1994)。MUs 代表群体统计学上独立的群体 ,通常根据等位基因频率的显著差异而划分 ,因而可作为种群短期管理的功能单位 ,如用于监测群体对人为影响和管理的反应。Moritz (1994)把 ESUs 定义为 :在 mtDNA 单倍型上互为单系群 ,在核基因座位上等位基因频率有显著差别的种群。Houlden et al. (1999)对澳大利亚考拉熊(*Phascolarctos cinereus*)地理种群线粒体基因序列分析发现 ,以前划分的 3 个亚种种群之间的遗传差异并不比地理种群间的差异大 ,他认为澳大利亚考拉熊在线粒体水平上表现为差异明显的地理种群 ,进行保护时应考虑它是由多个管理单元(MUs)构成的单一的进化显著单元(ESUs)。Barratt et al. (1999)对英国红松鼠(*Sciurus vulgaris*)的研究中也得到类似的结果。但鉴于由 mtDNA 得到的遗传关系未必总是与核基因相符 ,基因进化树也未必能反映出种群进化历史等原因 ,MUs 和 ESUs 在具体应用中有一定的局限性(Paetkau ,1999)。

2.2 隔离种群的基因流

大多数的物种都存在着形态和基因频率上的地理差异。地理种群间的差异程度取决于促使分化和促使趋同这两种力的平衡。基因突变、遗传漂变和环境条件压力将促进局部种群间的遗传分化 ,而配子、个体甚至整个群体的迁移(总称基因流)将模糊局部种群的遗传差异(Slantkin ,1987)。理论上 ,对种群间不同基因流产生的后果已经很清楚 ,但用常规生态学方法来检测内在的基因流则很困难。

推测基因流的方法有两类 :1)直接方法。传统种群研究者通过直接调查种群个体迁移 ,估计扩散距离和繁殖成功率以及个体标记等方法来推测观察时期的基因流量。这种方法局限性很大并且不够准确。跟踪目标群体的所有迁移个体而且准确测出每个迁移个体的繁殖成功率是很困难的 ,而且该方法只能检测当前的基因流 2)间接方法。用等位基因及其频率的空间分布推测过去的基因流。间接方法中又有两种估计方法 :一种方法是独立地看待多态位点 ,估测不同地理区域多态位点的等位基因频率(F_{ST}):

$$F_{ST} \approx 1/(1 + 2Nm)$$

(1)

N = 每个亚种群的个体数 , m = 每个亚群每世代的迁移率。

群体间基因流估计 :

$$< Nm >_f = 1/2[1/(F_{ST} - 1)]$$

(2)

式中 F_{ST} 为 F_{ST} 的估计值 ,估计 F_{ST} 可通过对比亚种群中随机个体序列间的平均差异得到。

(1)、(2)适用于单倍体生物或能被作为单倍基因组的线粒体基因。对于线粒体基因若是严格母系遗传 (1)中的 N = 每亚群中雌性个体数 ;对二倍体 (2)中的 2 用 4 取代 , N = 每亚群中二倍体的有效个体数。另一种是 Slantkin & Maddison(1989)提出的支序系统学方法 ,它基于岛屿模型结构种群样本的系统进化知识 ,先推导出样本的基因树 ,用保守估计获得 S (S 是同基因树和种群地理位置相符合的最低迁移事件发生数) ,然后用 S 推测基因流 $< N_m >_s$ 。Hudson(1992)比较了这两种估计方法的有效性 ,发现支序系统学方法对于存在重组现象的 DNA 不如 F_{ST} 方法好用 ,而且它不考虑系统分支长度 ,当基因流非常微量时便不能区分了。若是研究的 DNA 片段没有或很少重组现象时(如动物线粒体 DNA)则分支系统学方法似乎更精确一些 ,该方法已有一些应用(Patton et al. ,1996 ;Schneider ,1996)。但是 ,在实际研究中 ,由于通常不知道自然种群的系统进化关系 ,因而多采用 F_{ST} 方法(Barber ,1999b)。

上述对基因流大小的估计 ,通常假设种群处于遗传的平衡状态 ,有学者认为它似乎对行为生态和种群生态帮助不大(Hanski et al. ,2000) ,但无论分子标记预测或数学模型模拟都各有利弊 ,因此还需要与自然种群作更多的比较研究。

2.3 异质种群(metapopulation)

异质种群是通过个体扩散相互联系的局部种群的集合(Hanski ,1991)。种群统计学模型一直是研究异质种群动态的主要方法 ,种群长期定位观察或标记 - 释放 - 重捕法可以揭示种群间长距离运动和种群间的基因流 ,但大面积的广泛取样通常不可能 ,并且很难观察到不经常发生的迁移事件。分子标记的应用虽不能提供直接的种群状态和存活能力的信息 ,但它能跟踪基因或个体的长周期远距离迁移情况 ,对研究异质种群的个体迁移格局 ,栖息地需求和扩散格局都非常有用。

绿龟(*Helonia mydas*)是一种海洋濒危物种 ,它们的生活史和性成熟时间都很长 ,它们的繁殖场所距取食场所往往上千公里 ,个体调查难度很大 ,因此该物种的种群结构和状态以及繁殖分布情况一直是生态学家的难题。应用分子标记技术 ,能推测非繁

殖季节取食场所的个体来源地、种群结构和迁移情况的信息,为制定该物种保护措施提供了依据(Norman et al., 1994; Bowen & Avise, 1995)。在加利福尼亚中心峡谷的一种鲑鱼(*Oncorhynchus tshawytscha*)其冬季种群被作为濒危物种加以保护,而夏季的大量繁殖种群则不受重视(Nielsen et al., 1994)用线粒体标记研究该物种的种群结构后,发现冬季种群来自于夏季种群,因此要想保护该物种应加大对夏季种群的保护力度。

分子技术可应用于确定异质种群及其结构。Seppa & Laurila (1999)用分子技术研究了芬兰群岛的两栖动物种群结构,发现该地区的微咸海水不能阻碍两栖动物在岛屿之间的迁移,岛屿种群间遗传差异不大,种群分布状态不符合岛屿模型而是呈异质种群分布,岛屿种群间存在广泛基因交流,没有近交衰退现象。

以前许多控制实验结果显示近交压力导致种群适应性降低,但在自然种群中一般认为这种作用同种群统计因素和环境随机因素相比并不重要。Saccheri et al. (1998)研究了芬兰群岛的蝴蝶(*Melitaea cinxia*)异质种群,通过等位酶分析及野外调查发现隔离小种群种群下降甚至灭绝的主要原因是近交衰退,种群灭绝机率同近交衰退的指标——基因位点杂合度直接相关。这个结果不仅验证近交压力对自然种群的影响,也说明在保护栖息地丧失及片段化严重的小种群时要注意引进不同地区的近缘群,以消除近交压力的影响。

2.4 瓶颈效应

在进化过程中由于气候、地理等条件的影响,种群大小可能会迅速下降,导致遗传多样性损失的现象称瓶颈效应。如果种群在经历过瓶颈效应后迅速增长时(种群增长率高),位点的平均杂合度损失较小,且主要发生在开始的几个世代,一旦种群达到一定的数量,平均杂合度将不再下降(Nei et al., 1975)。相反,若种群长期处于瓶颈状态,则其遗传多样性会有很大损失,若长期得不到恢复,则会因近交衰退和环境压力影响而灭绝。借助分子技术可检测种群遗传多样性和基因位点平均杂合度,确定目标种群是否经历过瓶颈效应,以便采取相应措施保护和恢复种群。在许多动物种群尤其是珍稀动物的种群研究中,隔离种群间表现出很低的遗传多样性(张亚平,宿兵,1997; Zhang, 1996; Gullberg et al.,

1998; Bodkin et al., 1999),表明种群可能经历过瓶颈效应影响。

Gullberg et al. (1998, 1999)用微卫星标记法研究了瑞士10个不同地区沙蜥(*Lacerta agilis*)种群6个不同位点的遗传多样性差异,并同沙蜥分布中心的种群相比较,平均等位基因数和杂合度(3.3; 0.45)都低于中心种群(8.0; 0.7),进一步证明了由于该地区的地质历史及近代人为干扰因素使沙蜥种群在近代至少经历了一次瓶颈效应。Bodkin et al. (1999)用海獭(*Enhydra lutris*)自然种群说明长期瓶颈效应能导致种群遗传多样性降低。自然种群在经历过瓶颈效应后的恢复能力会因遗传多样性的损失而削弱。张亚平等(1997)对大熊猫(*Ailuropoda melanoleuca*)种群进行了遗传多样性分析,发现群体内和群体间的遗传多样性程度处于相近水平,其中一个可能的原因是由于大熊猫在晚更新世受到瓶颈效应的严重影响,形成较为均一的遗传背景。后来,随着群体的逐渐增大,遗传多样性得到一定程度的恢复。Westemier et al. (1998)对一种山鸡(*Tympanuchus cupido pinnatus*)自然种群研究表明,种群在繁殖能力和遗传多样性降低以后紧接着出现了长时期的种群下降。Li et al. (1998)对四川金丝猴(*Rhinopithecus roxellanae*)两个不同地理种群进行等位酶分析,发现所检测的44个遗传座位中,均为单态,平均杂合度为0,推断该物种经历过种群重建。

每位点的平均等位基因(alleles)数对种群生存力有重要影响。如果种群经历瓶颈效应后等位基因数显著下降,即使它的杂合度很高,种群适应能力也会受到影响。每位点的平均杂合度的降低不仅取决于瓶颈的大小,还决定于种群增长率。如果种群在经历过瓶颈效应后迅速增长,即使瓶颈非常小,位点平均杂合度也不会下降太多。例如Hoagland & Kilpatrick (1999)分析印第安小猫鼬(*Hepstes javanicus*)约在1877~1890年间入侵到夏威夷岛屿和周围群岛,从种群定居到作者研究时近100年时间,岛屿种群间遗传分化不显著,可能是由于种群迅速增长的缘故。另一方面,每位点的平均等位基因数的损失明显受瓶颈大小的影响,而并不依赖于种群增长率。这种差异主要是由于随机漂变消除了许多低频率的等位基因。然而当种群大小得到保持时,等位基因数就比平均杂合度增长快多了(Nei et al., 1975)。

对于经历过瓶颈效应的种群,保护的重点是阻止遗传多样性的继续降低和恢复种群的遗传多样性(聂龙等,1997)。对濒危的野生动物进行迁地保护是恢复和阻止种群下降的有效方法,鉴于种群瓶颈效应的影响应注意:1)将种群瓶颈效应尽可能地降低和缩短;2)从多个地点迁入大量个体;3)减少迁入之前的死亡率;4)选择适宜的生境(Bodkin et al.,1999)。

2.5 亲缘关系分析

个体间亲缘关系的确定是理解种群结构及动态的基础。种群个体间表现的社会关系通常不能够反应出它们的繁殖成功率(Hughes,1998;Gibbs et al.,1990),用分子标记方法容易得到个体间的亲缘关系,同时也能发现一些统计方法所无法检测到的现象,例如繁殖中的非配偶受精现象(extra-pair fertilization),寄生者与寄主之间并非有较近亲缘关系,社会群居的动物群体中个体的社会等级与繁殖成功率高低不成正比等现象(Hughes,1998)。

红尾黑鹂鸟(*Agelaius phoeniceus*)以一雄多雌制的方式繁殖,传统的观点认为雄鸟繁殖成功率是按其占有领地的筑巢数来统计的。然而Gibbs et al.(1990)用小卫星探针进行亲本鉴定,发现有几乎一半的巢中包含有至少一只来自非配偶父本的幼鸟。因此对于一只雄性个体来说,有20%以上的繁殖成功率是在其领地之外完成的。对亚特兰大鳗鱼(*Oncorhynchus nerka*)(Moran & Garcia-vazquez,1998)及埃塞俄比亚狼(*Canis simensis*)(Silero-zubiri et al.,1996)同一窝的后代群体进行亲本鉴定发现它们是由多个父本的后代组成,揭示了种群可能用该方式保持其遗传多样性。目前,研究的热点之一是年幼的个体和年长的个体非配偶繁殖机率比较研究及其对繁殖成功率的影响(Hughes,1998)。

小种群或人工种群中每个个体对种群过去和将来的基因贡献都非常关键,因此个体间的关系就很重要。对于迁移种群、入侵种群或人工种群,如果能确定出最初建群个体之间的关系,将有助于未来种群的管理(Haig,1998)。张亚平等(1997)用微卫星标记对13只人工饲养的大熊猫进行了亲缘关系分析,得出了繁殖能力较强的父本个体,这对于大熊猫人工繁殖过程中选择有效的雄性个体及理想的配对方案都十分必要。

3 用分子技术鉴定物种或亚种

应用分子标记分析种间遗传关系也非常普遍。在动物遗传关系分析中,尤其是种上水平的谱系关系的确定,线粒体基因是目前最为广泛使用的分子标记。因为线粒体是母系单亲遗传,它的有效种群的数量是核基因标记有效种群数量的四分之一,取样时需要相对少的样本数量来代表一个种群。一般认为在研究亲缘关系较近的类群的进化关系时,线粒体DNA得到的进化谱系比常染色体分析得到的进化谱系更接近于真实物种树(species tree)(Moore,1995)。区分物种的亲缘关系,建立类群系统发育关系对于生物多样性测度和保护目标的确定非常重要。

3.1 系统发育体系及系统发育多样性

多样性测度是生物多样性研究和保护的基本问题之一。传统的生态学方法以物种作为研究的基本单位,把所有物种同等对待,不能区分不同物种对生物多样性的贡献大小。尽管以后发展的稀有种理论比较简单,便于掌握和应用,但还是不能满足物种多样性保护的需要,特别是无法科学地衡量某一特定物种灭绝对多样性损失的影响(李义明,1998)。借助分子标记发展的系统多样性测度方法,主要基于系统发育和遗传学的理论和方法,能够比较科学地度量某一物种对类群多样性的贡献大小,从而使生物多样性测度研究获得了实质性进展。该方法比较复杂,只有在类群的系统发育树或遗传资料比较齐全时才能使用。

应用分子技术已对两栖动物(江建平,周开亚,2001;Vences et al.,1998)、哺乳动物(丁波等,1997a,1997b;宿兵等,1997;王文等,1997a,1997b;张亚平等,1997;Zhang & Ryder,1993;Zhang et al.,1998;Saitbekova et al.,1999)、鱼类(Takahashi et al.,1998;Heist & Gold,1999)、对虾(Song et al.,1998)等类群的分子遗传谱系关系进行了大量的分析,确定了物种或同一物种不同品系间的亲缘关系。同时分子标记还能有助于解决一些物种在形态分类上无法确定的问题,澄清一些物种的分类地位(Zhang & Shi,1991),对保护措施制定以及认清所保护的物种的重要性有指导意义。例如,在北美东部有一种全部为雌性的无性系蜉种群,一直认为它们是由4个有性繁殖近缘种杂交而来

的,杂交种的基因型是由两性近缘种基因型的 2 个或 3 个混合而来的,有二倍体,三倍体,四倍体或五倍体。通过线粒体基因遗传差异检测,发现在线粒体基因谱系图中,单性系螺同其他 4 个物种并无重叠,它可能起源于一个独立的母系祖先(Spolsky et al. ,1992)。由此确定该种群的保护目标是分清这些混合类型,合理划分保持单元,使种群能稳定持续发展。

系统发育多样性为生物多样性保护目标的确定提供了有用的测度方法。借助分子标记可以知道被保护的物种与其他物种的关系、估计如果保护对象灭绝所造成的生物多样性损失的大小,这在原有以稀有种确定保护优先顺序的基础上提供了一种选择的依据。有人认为,与其他近缘种分离年代久远的一些特有种,携带着有关过去进化繁盛的信息,而在别处这些特有种已被适应变化环境的世系所代替。这些特有种的中心或残遗种群最有可能进化成新物种,是未来生物多样性的发生器,它们应该优先给予保护(李义明,1998)。用分子生态学方法,只要推测出种群分离时间以及群体间的遗传关系,这些特有种就容易确定出来并加以保护。系统发育多样性测度可以用于自然保护区选择决策,但在保护区选择过程中,除了考虑生物学标准,如系统发育多样性、稀有种、特有种外,还要考虑对人类有意义的物种,如具有重要审美价值、伦理学价值、经济价值及濒危物种(李义明,1998),因此在实际应用中还要与其他方法结合起来,综合确定保护目标。

分子钟在研究物种的进化速率方面很有用。分子钟是指某一特定的蛋白质和核酸分子在进化过程中每年发生的位点置换率(进化速率)是恒定的(不同分子的进化速率可能不同),因此每一种蛋白质和核酸分子都以其特定的节拍为进化过程计时(Zuckermandl & Pauling,1965)。由于人们不可能得到生物进化历史的全面记录,只能根据动物种群某种基因的平均变异速率和基因的变异程度估计种群间分离时间,并得到物种谱系关系。20 世纪 70 年代以来线粒体 DNA 一直被作为研究生物历史的最有力工具。线粒体分子钟的应用解决了一些问题,如两栖动物三大类群间亲缘关系的确定,以及鼯鼠科(Soricidae)进化地位的解决。然而 Naylor & Brown 对 19 个脊椎动物进化树拟合的结果却与设想的大相径庭(Balter,1997),分子钟的精确性开始

被许多人所怀疑。由于线粒体在生物个体内存在两型甚至三型现象(Gibbons,1998a),用分子钟确定的动物分化年代与化石记载的冲突,使有记载的地质历史出现了上百万年的空白(Strauss,1999)等,表明分子钟在进化中并不是恒定的,它在不同生物群体和不同历史时期,可以以不同的速率演化(Gibbons,1998a;Strauss,1999)。而且不同基因片段的演化速率有快有慢,这都给分子钟的应用带来问题。Hedges 和 Kumar 等(Strauss,1999)用化石记载年代明确的物种来校正基因片段分子钟,然后用于计算其他脊椎动物的分化时间,提高了分子钟的精确性。还有人认为,由于回复突变等影响,分子钟对于研究古老历史不如用近代的分析方法更为有效(Gibbons,1998b)。

3.2 近缘种杂交现象

近缘种间的渗透杂交对动物种群生存的影响既有增加种群遗传多样性、适合度和适应性等有利方面(Roelke et al. ,1993;O'Brien,1994),也有降低遗传多样性、增加遗传同化和远交压力等不利方面(Ryman et al. ,1995)。研究杂交问题不仅对种群保护有重要作用,而且由于保护措施和政策还会影响到保护地区居民生活和工业发展的决策,因此该问题的研究也有一定的政治和经济意义(Haig,1998)。分子技术的发展提供了更详细了解系统分类关系和基因流历史的方法。以下是几个用分子标记研究杂交问题的例子。

美国鲑鱼(*Salmo salmo*)种群之间存在本地种和非本地种以及亚种间和品系间的广泛杂交(Al-lendorf & Leary,1995;Ryman et al. ,1995),当前保护重点是分清这些遗传杂交类型,保持种间的遗传差异,以保证种群长期存活能力。对鲑鱼种群的管理措施会影响到地方经济和渔民的生活,而且当地发电厂和木材公司也会受保护政策的影响。其中最值得关注的一个种是 *Salmo clarki*,线粒体分析显示该种鲑鱼本地种和非本地种之间的杂交是本地种群下降的主要原因,杂交种群使得本地种群间彼此分离,增加了灭绝的危险,应该移走一些杂交种群使本地种群得以互相杂交保持种群发展(Ryman et al. ,1995)。

借助分子标记对佛罗里达豹(*Felis concolor*)的分析反映出近缘种间的杂交可能提高种群的存活力。一系列分子水平的研究(等位酶、线粒体和微

卫星)表明该种群遗传多样性比其他豹种群低,且有明显的近交衰退现象(Roelke et al., 1993)。因为佛罗里达豹基因库已明显萎缩,所以计划引进得克萨斯亚种(*F. c. stanleyana*)并希望它们的杂交种能够存活下来。O'Brien(1994)证明这种措施是成功的。这种杂交计划不仅增加了种群遗传多样性,而且提高了繁殖率,增加了种群数量。

微卫星、基因测序等高特异性分子技术可以更深入的研究近缘种杂交问题。弄清各种群之间的关系,就可以确定种间的遗传渗透是有利的还是有害的,对制定这些种群的管理措施很有帮助。

4 讨论

利用生态学中的常规野外调查方法得到的有关种群结构和状态方面的信息是十分有限的,因为很难确定种群中每个个体的迁移情况及迁移个体的繁殖成功率,尤其对那些长距离迁移物种、比较隐蔽的物种、水生物种和在土壤中生存的物种等,若不借助分子技术将很难深入地了解它们(Parker et al., 1998; Haig, 1998)。因此保护生物学与分子生物学相结合已成为当前的热点之一(Haig, 1998),也已取得了一些成果。分子标记的应用发展了传统种群理论,如遗传多样性对异质种群动态的影响、鸟类及某些兽类的配偶制度、寄主和寄生生物间的亲缘关系等,而且还解决了统计调查方法所解决不了的基因流、个体及种群亲缘关系鉴定等问题。

分子标记的应用有助于更清楚地了解种群间关系、种群动态及其进化历史,从而为物种保护和种群控制提供了更精确的科学依据。种群地理分布格局研究对于稀有种及广布种的成因研究非常重要。种群间基因流的测定、异质种群动态以及瓶颈效应对种群的影响等研究对于稀有种的迁地保护和就地保护政策的制定提供了指导。种群个体间亲缘关系的确定,对研究动物繁殖成功率、社会等级关系及维持种群遗传多样性水平非常重要。利用种或品系特异性分子标记,可以确定系统发育关系以及近缘种杂交在遗传上的利弊。系统发育多样性测度对于精确地确定生物多样性测度,确定保护目标及保护区选择决策等很有用。

国内分子生态学的研究着重于种群系统发育关系(王义权等, 1996; 李思发等, 1998; 李庆伟等, 1998;)、物种鉴定(侯林等, 1997)、地理种群遗传差

异分析(杨光, 周开亚, 1997)等方面。《中国动植物的遗传多样性》(胡志昂, 张亚平, 1997)中综合论述了昆明动物所在大熊猫、金丝猴等珍稀濒危动物和几种主要家畜种群分子生态的研究,代表了该领域的主要进展。遗传多样性研究为濒危动物保护和种群恢复提供了分子依据,有利于制定以遗传管理为指导的繁育计划,斯氏瞪羚(*Gazella spekei*)的种群恢复是一个很好的借鉴(张亚平, 宿兵, 1997)。对于家禽遗传多样性的研究有利于保持品种资源的多样性、探讨品种的起源和品种间的遗传分化关系以及为品种资源的利用和保护提供基础资料(胡志昂, 张亚平, 1997)。

随着分子技术的不断发展,会有更多的种群保护问题得到解决。最近提出的主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)DNA 标记技术,已开始用于种群结构和遗传多样性保护的研究(Hedrick, 1994)。MHC 基因的产物有高度多态性,能用来辨认潜在的外源性有害抗原,已被用于瑞士麋鹿种群(*Aleces aleces*)和鲸种群(*Delphinapterus lecuas*)的遗传多样性研究(Haig, 1998)。MHC 的等位基因多样性还可用于小种群或人工种群的研究。但是有关该标记的特异性还有一些争议,需要用已经研究过的物种的结果来检验它是否实用。MHC 技术有助于研究种群对疾病的易感性等一系列种群特异性问题(Haig, 1998)。

生物多样性保护不仅要使全球的生物多样性保存量最大,更重要的是如何使生物多样性损失最小,以及保护生物种群持续生存和繁衍依赖的生态环境。目前对自然种群遗传多样性与种群统计学之间的关系研究还很少(Bodkin et al., 1999)。一种新的研究思路是在生态系统水平上横向分析栖息地破碎对多个物种和种群的影响(Avise, 1992)。美国东南部 19 个物种的线粒体基因分析显示出,栖息地片段化对不同种群的影响非常相似。如果对目标物种同时应用多个分子标记,并与传统统计调查方法相结合,所得到的结果可能会更有说服力(Haig, 1998)。

致谢 张德兴研究员对本文提出很好的修改建议,在此表示衷心感谢。

参考文献

丁波, 宿兵, 王文, 兰宏, 刘爱华, 张亚平, 1997a. 金丝猴的分

- 子进化与遗传多样性. 见:胡志昂,张亚平(主编),中国动植物的遗传多样性. 杭州:浙江科学技术出版社,46~56
- 丁波,宿兵,张亚平,1997b. 熊超科的分子进化与遗传多样性. 见:胡志昂,张亚平(主编),中国动植物的遗传多样性. 杭州:浙江科学技术出版社,27~39
- 侯林,蔡含筠,邹向阳,杨光,1997. 中国两性生殖虫同功酶基因的表达式及分类地位. 动物学报,43(2):184~191
- 胡志昂,张亚平(主编),1997. 中国动植物的遗传多样性. 杭州:浙江科学技术出版社.
- 江建平,周开亚,2001. 中国林蛙的分子系统关系. 动物学研究,22(1):27~32
- 李庆伟,林津,文伟,李文正,曾养志,1998. 鸮形目8种鸟类线粒体DNA的多态性研究. 动物学报,44(1):94~101
- 李思发,吕国庆,贝纳切兹 L,1998. 长江中下游鲢鳙草青四大家鱼线粒体DNA多样性分析. 动物学报,44(1):82~93
- 李义明,1998. 系统发育多样性测度及其在生物多样性保护中的应用. 生物多样性,6(1):49~54
- 聂龙,陈永久,兰宏,张亚平,文际坤,俞英,杨关福,张细权,1997. 牛的遗传多样性. 见:胡志昂,张亚平(主编),中国动植物的遗传多样性. 杭州:浙江科学技术出版社,111~123
- 宿兵,陈永久,刘瑞清,张亚平,1997. 长臂猿的分子进化. 见:胡志昂,张亚平(主编),中国动植物的遗传多样性. 杭州:浙江科学技术出版社,93~103
- 王文,兰宏,杨凤堂,马彩霞,张亚平,1997a. 鹿属动物的遗传变异和进化. 见:胡志昂,张亚平(主编),中国动植物的遗传多样性. 杭州:浙江科学技术出版社,19~24
- 王文,宿兵,杨凤堂,张亚平,1997b. 中国猕猴类的分子进化与遗传多样性. 见:胡志昂,张亚平(主编),中国动植物的遗传多样性. 杭州:浙江科学技术出版社,55~87
- 王义权,周开亚,秦树臻,1996. 用RAPD标记检测6种蛇基因组DNA多态性. 动物学报,42(2):172~181
- 杨光,周开亚,1997. 中国水域江豚种群遗传多样性遗传变异的研究. 动物学报,43(4):411~419
- 张亚平,宿兵,1997. 大熊猫的遗传多样性. 见:胡志昂,张亚平(主编),中国动植物的遗传多样性. 杭州:浙江科学技术出版社,7~17
- Allendorf F and Leary R F, 1995. Conservation and distribution of genetic variation in a polytypic species, the Cutthroat Trout. *Conservation Biology*, 2:170~184
- Avise J C, 1992. Molecular population structure and the biogeographic history of a regional fauna: a case history with lessons for conservation biology. *Oikos*, 63:62~76
- Balter M, 1997. Morphologists learn to live with molecular upstarts. *Science*, 276(16):1032~1034
- Barber P H, 1999a. Phylogeography of the canyon treefrog, *Hyla aranicolor* (Cope) based on mitochondrial DNA sequence data. *Molecular Ecology*, 8:547~562
- Barber P H, 1999b. Patterns of gene flow and population genetic structure in the canyon treefrog, *Hyla aranicolor* (Cope). *Molecular Ecology*, 8:563~576
- Barinova A A, Nakajima M and Fujio Y, 1998. Genetic variability and differentiation of both cultured strains and natural populations in the guppy *Poecilia reticulata*. *Fisheries Science(Tokyo)*, 64(6):898~902
- Barratt M, Gurnell J, Malarky G, Deaville R and Bruford M, 1999. Genetic structure of red squirrel (*Sciurus vulgaris*) in the U. . *Molecular Ecology*, 8(12):555~563
- Bensch and Hasselquist D, 1999. Phylogeographic population structure of great reed warblers: an analysis of mtDNA control region sequences. *Biological Journal of the Linnean Society*, 66(2):171~185
- Bernardi G and Crane N L, 1999. Molecular phylogeny of the humbug damselfish inferred from mitochondrial DNA sequences. *Journal of Fish Biology*, 54(6):1210~1217
- Bodkin J L, Ballachey B, Cronin M A and Cribner T, 1999. Population demographics and genetic diversity in remnant and translocated populations of sea otters. *Conservation Biology*, 13(6):1378~1385
- Bowen B W and Avise J C, 1995. Conservation genetics of marine turtles. In: Avise J C, Hamrick J L (eds.), *Conservation Genetics: Case Histories From Nature*. Columbia University Press, New York, SA. 190~237
- Boyce M, Ramey R R, Rodell T C, Rubin E and Singer R, 1999. Population subdivision among desert Bighorn sheep (*Ovis canadensis*) ewes revealed by mitochondrial DNA analysis. *Molecular Ecology*, 8(1):99~106
- Bremer J, Alvarado R, Tequert B, Roberson N and Ly B, 1998. Genetic evidence for inter-oceanic subdivision of Bigeye Tuna (*Thunnus obesus*) populations. *Marine Biology*, 132(4):547~557
- Dergam J A, Ueki H, Uhibatta A, Duboc L F, Julio H F, Lucia G C and Black C, 1998. Molecular biogeography of the neotropical fish *Hopliad malabaricus* (Cyprinidae: Characiformes) in the Iguacu, Tibagi, and Parana Rivers. *Genetics and Molecular Biology*, 21(4):493~496
- Fedorov V B, Fredga K and Jarrell G H, 1999. Mitochondrial DNA variation and the evolutionary history of chromosome races of collard lemmings (*Dicrostonyx*) in the Eurasian Arctic. *Journal of Evolutionary Biology*, 12(1):134~145
- Garcia-Marin J L, Mitter F M and Pala C, 1999. Postglacial colonization of brown trout in Europe based on distribution of allozyme variants. *Heredity*, 82(1):46~56
- Gavin T A, Sherman P, Yensen and May B, 1999. Population genetic structure of the northern Idaho ground squirrel (*Spermophilus brunus brunus*). *Journal of Mammalogy*, 80(1):156~168
- Gibbons A, 1998a. Calibrating the mitochondrial clock. *Science*, 279(2):28~29
- Gibbons A, 1998b. Genes put mammals in age of dinosaurs. *Science*, 280(1):675~676
- Gibbs H L, Eartherhead P J, Boag P U, White B N, Tabak L M and Hovsak D J, 1990. Realized reproductive success of polygynous red-winged blackbirds revealed by DNA markers. *Science*, 250:1394~1397
- Grobler J P and Matlala M. J, 1998. A preliminary biochemical genetic survey of four south African painted reed frog (*Hyperolius marmoratus*) population. *Journal of Zoology*, 33

(4): 226 ~ 229

Gullberg A, Olsson M and Tegelstrom H, 1998. Colonization, genetic diversity, and evolution in the Swedish sand lizard, *Lacerta agilis* (Reptilia, Squamata). *Biological Journal of the Linnean Society*, **65**(3): 257 ~ 277

Gullberg A, Olsson M and Tegelstrom H, 1999. Evolution in populations of Swedish sand lizards: genetic differentiation and loss of variability revealed by multilocus DNA fingerprinting. *Journal of Evolutionary Biology*, **12**(1): 17 ~ 26

Haig S M, 1998. Molecular contributions to conservation. *Ecology*, **79**(2): 413 ~ 425

Hanski I, 1991. Single-species metapopulation dynamics: concepts, models and observations. *Biological Journal of the Linnean Society*, **42**: 17 ~ 38

Hanski I, Alho J and Moilanen A, 2000. Estimating the parameters of survival and migration of individuals in metapopulation. *Ecology*, **81**(1): 239 ~ 251

Hara M, Selino M and Uthairat N-N, 1998. Genetic differentiation of natural populations of the snake-head fish, *Channa striatus* in Thailand. *Fisheries Science(Tokyo)*, **64**(6): 882 ~ 885

Hedrick P W, 1994. Evolutionary genetics of the major histocompatibility complex. *American Naturalist*, **143**: 945 ~ 964

Heist E J and Gold J R, 1999. Genetic identification of sharks in the U. S. Atlantic large coastal shark fishery. *Fishery Bulletin*, **97**(1): 53 ~ 61

Hoagland D B and Kilpatrick C W, 1999. Genetic variation and differentiation among insular population of the small Indian mongoose (*Herpestes javanicus*). *Journal of Mammalogy*, **80**(1): 169 ~ 179

Houlden B A, Costello B H, Sharkey D, Flower E V, Melzer A, Ellis W, Carrick F, Baverstock P R and Elphinstone M S, 1999. Phylogeographic differentiation in the mitochondrial control region in the koala, *Phascolarctos cinereus* (Goldfuss 1817). *Molecular Ecology*, **8**: 999 ~ 1011

Hudson R R, Slantkin M and Maddison W P, 1992. Estimation of levels of gene flow from DNA sequence data. *Genetics*, **132**: 583 ~ 589

Hughes C, 1998. Integrating molecular techniques with field methods in studies of social behavior: a revolution results. *Ecology*, **79**(2): 383 ~ 399

Li H P, Zhang Y P, Meng S J, Men Z M, Han J L, Feng N and Zhang G Q, 1998. Low genetic diversity in sichuan snub-nosed monkey revealed by protein electrophoresis and its significance to conservation biology. *Zoological Research*, **19**(6): 417 ~ 421

Matsui M, Tomoko T-U, Paik N-K, Yang S-Y and Takenaka O, 1998. Phylogenetic relationships among local populations of *Zana dybowskii* assessed by mitochondrial cytochrome b gene sequences. *Japanese Journal of Herpetology*, **17**(4): 145 ~ 151

Moore W S, 1995. Inferring phylogenies from mtDNA variation: mitochondrial-gene trees versus nuclear-gene trees. *Evolution*, **49**(4): 718 ~ 726

Moran P and Garcia-Vazquez E, 1998. Multiple paternity in Atlantic salmon: a way to maintain genetic variability in relicted populations. *Journal of Heredity*, **89**(6): 551 ~ 553

Moritz C, 1994. Defining evolutionarily significant units for conservation. *Trends in Ecology and Evolution*, **9**: 373 ~ 375

Nei M, Maruyama T and Chakraborty R, 1975. The bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evolution*, **29**: 1 ~ 10

Nielsen J L, Tupper D and Thomas W K, 1994. Mitochondrial DNA polymorphism in unique runs of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) from the Sacramento-San Joaquin River Basin. *Conservation Biology*, **8**: 882 ~ 884

Norman J A, Moitz C and Linous C J, 1994. Mitochondrial DNA control region polymorphism: genetic markers for ecological studies of marine turtles. *Molecular Ecology*, **3**: 363 ~ 373

O'Brien S J, 1994. A role for molecular genetics in biological conservation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **91**: 5748 ~ 5755

Paetkau D, 1999. Using genetics to identify intraspecific conservation units: a critique of current methods. *Conservation Biology*, **13**(6): 1507 ~ 1509

Parker P G, Snow A A, Schug M D, Booton G C and Fuerst P A, 1998. What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. *Ecology*, **79**(2): 361 ~ 382

Patton J L, Da Silva M N F and Malcom J R, 1996. Hierarchical genetic structure and gene flow in three sympatric species of Amazonian rodents. *Molecular Ecology*, **5**: 229 ~ 238

Paul H B, 1999a. Phylogeography of the Canyon Treefrog, *Hyla aranicolor* (Cope) based on mitochondrial DNA sequence data. *Molecular Ecology*, **8**: 547 ~ 562

Rabinowitz D, Cairnes S and Dillon T, 1986. Seven forms of rarity and their frequency in the flora of the British Isles. In: Soule M E (ed.), *Conservation Biology: The Science of Scarcity and Diversity*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. 182 ~ 204

Roelke M E, Martenson J S and O'Brien S J, 1993. The consequences of demographic reduction and genetic depletion in the endangered Florida Panther. *Current Biology*, **3**: 340 ~ 350

Ryman N, Utter F and Hindar K, 1995. Introgression, Supportive Breeding and Genetic Conservation Population Management for Survival and Recovery. New York: Columbia University Press, 341 ~ 365

Saccheri I, Kuussaari M, Kankare M, Vilman P, Fortelius W and Hanski I, 1998. Inbreeding and extinction in a butterfly metapopulation. *Nature*, **392**: 491 ~ 494

Saitbekova N, Gaillard C, Obexer-Ruff G and Dolf G, 1999. Genetic diversity in Swiss goat breeds on microsatellite analysis. *Animal Genetics*, **30**(1): 36 ~ 41

Scandura M, Tiedemann R, Apollonio M and Hartl G B, 1998. Genetic variation in an isolated Italian population of fallow deer: *ama dama* as revealed by RAPD-PCR. *Acta Theriologica (suppl. 5)*: 163 ~ 169

Schneider C, 1996. Distinguishing between primary and secondary intergradation among morphologically differentiated populations of *Notophthalmus virgatus* (Anura: Salamanders). *Conservation Biology* 5: 239 ~ 249

Seppa P and Laurila A, 1999. Genetic structure of island population of the anurans *Rana lessonae* and *Rana sylvatica*. *Conservation Biology* 8: 309 ~ 317

Silero-zubiri C, Gottelli D and Macdonald D W, 1996. Male philopatry, extra-pack copulations and inbreeding avoidance in Ethiopian wolves (*Canis simensis*). *Conservation Biology* 5: 331 ~ 340

Slantkin M, 1987. Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Evolution* 23: 787 ~ 792

Slantkin M and Maddison W P, 1989. A cladistic measure of gene flow inferred from the phylogenies of alleles. *Evolution* 12: 603 ~ 613

Song L S, Xiang J H, Li C X, Zhou L H, Liu R Y and Fan Y J, 1998. Studies on genetic variation and phylogenetic relationships among six species of *Amphibia* by RAPDs markers. *Acta Zool Sinica* 44(3): 353 ~ 359

Spolsky C M, Phillips C A and Uzzell T, 1992. Antiquity of clonal salamander lineages revealed by mitochondrial DNA. *Conservation Biology* 3: 706 ~ 708

Strauss E, 1999. Can mitochondrial clocks keep time? *Evolution* 23(5): 1435 ~ 1438

Takahashi H, Nirasawa K, Nagamine Y, Tsudzuki M and Yamamoto Y, 1998. Genetic relationship among Japanese native breeds of chicken based on microsatellite DNA polymorphisms. *Journal of Heredity* 89(6): 543 ~ 546

Vences M, Hille A and Glaw F, 1998. Allozyme differentiation in the genus *Phrynobatrachus* (Amphibia: Anura: Mentellinae). *Conservation Biology* 4: 261 ~ 274

Waters J M and Burrige C P, 1999. Extreme intraspecific mitochondrial DNA sequence divergence in *Stethacanthus* (Stethacanthiformes: Galaxiidae), one of the most widespread freshwater fish. *Conservation Biology* 11(1): 1 ~ 12

Weisrock D W, Haselkorn T S and Janzen F J, 1998. Lack of genetic variation in cytochrome *b* in a population of smooth softshell turtles. *Conservation Biology* 10(4): 158 ~ 160

Westemier R L, Brawn J D, Simpson S A, Esker T L, Jansen R W and Walk J W, 1998. Tracking the long-term decline and recovery of an isolated population. *Conservation Biology* 2: 1695 ~ 1698

Zhang Y P and Ryder O A, 1993. Mitochondrial DNA sequence evolution in the Arctoidae. *Journal of Molecular Evolution* 37: 9557 ~ 9561

Zhang S, Xu J C and Zhang Y P, 1998. Genetic diversity of Zhejiang native pig breeds inferred from mtDNA polymorphism. *Conservation Biology* 12(2): 125 ~ 130

Zhang Y P, 1996. Genetic variability and conservation relevance of the sun bear as revealed by DNA sequences. *Conservation Biology* 17(4): 459 ~ 468

Zhang Y P and Shi L M, 1991. Ruddle of the giant panda. *Conservation Biology* 2: 573

Zuckerkandl E and Pauling L, 1965. Evolutionary divergence and convergence in proteins. In: Bryson V, Vogel H J, (eds.), *Evolution of the Gene*. New York: Academic Press, 97 ~ 116

(责任编辑：时意专)