

doi: 10.7541/2023.2022.0105

北部湾涠洲岛海域栖息布氏鲸种群的物种鉴定

何瑞琳^{1,2} 陈默³ 张瑶瑶¹ 梅志刚^{1,4} 范飞^{1,4} 王丁^{1,4} 郑劲松^{1,4}

(1. 中国科学院水生生物研究所, 中国科学院水生生物多样性与保护重点实验室, 武汉 430072; 2. 中国科学院大学, 北京 100049; 3. 广西科学院, 广西水生生物联合实验室, 南宁 530007; 4. 国家水生生物种质资源库, 武汉 430072)

摘要: 布氏鲸(Bryde's whale)是广泛分布于温带和热带海域的一类中等体型须鲸, 通常认为存在小布氏鲸(*Balaenoptera edeni edeni*)和布氏鲸(*B. e. brydei*)两个亚种。然而, 有研究表明它们应该被划分为两个独立物种, 即近岸小型布氏鲸(*B. edeni*)和远洋大型布氏鲸(*B. brydei*)。由于两者外部形态极其相似, 并且存在同域分布现象, 很难基于外观进行准确的物种鉴定。近年来, 广西北部湾涠洲岛海域出现一个稳定的布氏鲸栖息种群, 但目前尚不清楚属于哪种布氏鲸。研究采集了涠洲岛布氏鲸种群中两个体的粪便样品, 从其中一份样品成功提取基因组DNA, 并基于线粒体Cyt *b*和COI基因序列开展物种鉴定和遗传分析, 鉴定结果为小布氏鲸。此外, 还鉴定出涠洲岛海域同年死亡的一头须鲸也为小布氏鲸。据此推测涠洲岛水域栖息的布氏鲸种群可能是小布氏鲸。研究首次基于粪便样品, 采用分子生物学技术, 成功开展了活体布氏鲸的物种鉴定。这种基于非损伤采样的物种鉴定方法值得进一步优化并推广应用。

关键词: 物种鉴定; 非损伤采样; Cyt *b*; COI; 北部湾; 布氏鲸

中图分类号: Q959.841

文献标识码: A

文章编号: 1000-3207(2023)04-0666-08



布氏鲸(Bryde's whale)隶属鲸目(Cetacea)、须鲸亚目(Mysticeti)、须鲸科(Balaenopteridae)、须鲸属(*Balaenoptera*), 是广泛分布于温带和热带水域的一类中等体型须鲸^[1, 2]。布氏鲸的分类问题目前尚未解决, 世界自然资源保护联盟(IUCN, International Union for Conservation of Nature and Natural Resources)和国际捕鲸委员会(IWC, International Whaling Commission)均认为布氏鲸有两个亚种, 即小布氏鲸(*Balaenoptera edeni edeni*)和布氏鲸(*B. e. brydei*)。但近年来, 越来越多的研究证明小布氏鲸与布氏鲸应该划分为两个独立的物种: 近岸小型的为小布氏鲸(*B. edeni*), 远洋大型的为布氏鲸(*B. brydei*)^[2-5]。2003年, 基于外部形态、头骨和线粒体DNA控制区变异等方面与同属其他物种存在显著性的差异, Wada等^[3]从原来认定的布氏鲸中鉴定并描述了一个新的须鲸物种——大村鲸(*B. omurai*); 此外, Wada等^[3]发现布氏鲸和小布氏鲸在938 bp的线粒体DNA控制区中存在35个核苷酸差异, 大于布

氏鲸和塞鲸(Sei whale, *B. borealis*)之间的差异, 因此提出*B. edeni*和*B. brydei*是两个物种, 并且认为这两种布氏鲸在西太平洋均有分布。2006年, Sasaki等^[4]利用线粒体DNA控制区全序列及核DNA短散布重复元件(SINE, Short interspersed repetitive element)两种遗传标记开展了须鲸进化历史研究, 进一步证实大村鲸是比布氏鲸更早分化的物种, 并且支持*B. edeni*和*B. brydei*是两个独立物种。

布氏鲸头部上颌前端至呼吸孔有一条明显的脊线, 高1—2 cm, 中央脊线的两侧又各有一条明显的副脊线, 这3条明显的脊线是布氏鲸区别于其他须鲸的最重要的外观特征之一。小布氏鲸腹部中央褶沟最长可至脐部, 且由脐部到生殖裂则另有一条褶沟, 这是小布氏鲸区别于其他须鲸的另一个重要特征^[2]。但小布氏鲸和布氏鲸外观非常接近, 仅在性成熟时存在个体大小差异, 并且在部分海域存在同域分布现象^[2], 因此野外活体或者搁浅死亡个体很难基于外观特征进行鉴别, 通常需要借助分子

收稿日期: 2022-03-25; 修订日期: 2022-05-17

基金项目: 国家自然科学基金(31870372); 中国科学院生物多样性保护项目(ZSSD-004)资助 [Supported by the National Natural Science Foundation of China (31870372); Biodiversity Conservation Project of Chinese Academic of Sciences (ZSSD-004)]

作者简介: 何瑞琳, 女, 硕士研究生; 主要从事鲸类保护遗传学研究。E-mail: heruilin14@gmail.com

通信作者: 郑劲松, 男, 博士, 副研究员; 主要从事鲸类保护遗传学与分子生态学研究。E-mail: zhengjinsong@ihb.ac.cn

生物学手段来准确鉴定。

布氏鲸在中国水域如黄海、东海和南海都有分布,在浙江、上海、福建、广东和广西沿海均有搁浅记录^[2,6]。1992—2009年,北部湾及其附近海域先后搁浅14头布氏鲸,说明北部湾海域可能经常出现布氏鲸,提示这个区域可能是布氏鲸种群的常驻海域^[2]。然而,此前这些搁浅死亡的个体主要基于外观来判断物种,缺少分子鉴定依据,因此对于不够新鲜或不完整的尸体存在较高误判风险。2019年,基于渔民问卷调查和海上实地考察,Chen等^[7]首次证实北部湾涠洲岛水域分布一个比较稳定的布氏鲸群体,通过连续的调查,拍摄到捕食活动,推测涠洲岛海域可能是一个重要的布氏鲸摄食场。这是首次报道在中国近岸海域发现布氏鲸摄食场,而目前已知的最邻近的布氏鲸摄食栖息地在泰国湾上部^[8]。随后,我国科研人员先后对该群体开展了捕食生态学^[9]、卫星跟踪^[10]及声学监测^[11]等研究工作。吴采雯等^[12]使用D-loop和Cytb基因,鉴定出2019年3月在北部湾涠洲岛水域死亡的一头须鲸为小布氏鲸,为该布氏鲸种群的物种归属提供了一些分子证据。然而,Zhao等^[13]鉴定出2019年1月在北部湾北仑河口搁浅死亡的一头须鲸为大村鲸。由于小布氏鲸、布氏鲸和大村鲸外观相似并且存在同域分布现象,因此涠洲岛水域栖息的布氏鲸种群到底属于哪一种,以及是否存在2个以上物种等问题,依然需要更多研究来证实。

对于濒危哺乳动物,因其数量稀少且珍贵,基于非损伤式取样进行遗传分析已经成为开展濒危动物保护遗传学研究的重要方法^[14]。鲸类终生生活于水中,其活动范围广阔,并且出水呼吸时间短暂,加之动物伦理学的限制,通过获取其活体组织样本开展研究具有较大难度,因而非损伤性研究模型的建立已成为鲸类保护生物学探索的重要方向^[15-17]。哺乳动物的粪便中含有从宿主消化道脱落的上皮细胞,采用合适的方法可以提取基因组DNA,并开展后续遗传学分析。目前,基于粪便样品采集的非损伤性采样已普遍应用于濒危野生动物的保护遗传学研究。例如,朱亮等^[18]从大熊猫的新鲜粪便样本中提取较高质量的DNA,并将其应用于大熊猫DRB基因的遗传多样性研究。本研究从涠洲岛布氏鲸种群成功采集到两头动物的粪便样本,尝试提取其基因组DNA,并利用线粒体细胞色素*b*基因(Cyt *b*)和细胞色素*c*氧化酶 I 基因(CO I)两种分子标记对该种群进行物种鉴定和遗传分析。

1 材料与方法

1.1 样本采集

我们研究团队在涠洲岛水域进行布氏鲸种群生态考察时曾观察到鲸排便现象,并对相应个体进行了拍照识别。2019年11月8日观察到一头布氏鲸排出粪便,呈团状漂浮在海面上,等鲸游开后,考察队员打捞粪便样,保存于10 mL无菌离心管中,冷藏,带回实验室后冻存于-80℃冰箱中,样品编号为WZD201911。2020年9月15日,考察队员再次观察到一头布氏鲸排便,但粪便很快分散开来,等鲸鱼游开后,考察艇靠近排便现场,队员采集含粪便的水样约1000 mL,冷藏,带回实验室后用抽滤设备过滤水样(使用孔径0.45 μm混合纤维素酯滤膜),将滤膜对折放进10 mL无菌离心管中,冻存于-80℃冰箱中,样品编号为WZD202009。这两头鲸鱼均显示出布氏鲸独特的外观鉴别特征:上颌顶部有3条明显的脊线(图1)。然而,基于这些照片无法确定它们是布氏鲸还是小布氏鲸。

此外,2019年3月31日广西北海涠洲岛海域死亡一头雄性须鲸,体长约12 m,上颌顶部有3条明显的脊线,疑似小布氏鲸。我们采集到这头死亡须鲸的肌肉样本,保存于无水乙醇中,用于后续物种鉴定,标本编号为WZD201903。

1.2 样本基因组DNA提取

对于保存在乙醇中的肌肉样本WZD201903,取样50—100 mg,用无菌眼科剪刀剪成小碎末,经过脱乙醇预处理,之后用传统的氯酚萃取法提取基因组DNA。对于粪便样本WZD201911和WZD202009,使用商用试剂盒Quick-DNA™ Fecal/Soil Microbe Miniprep Kit(Zymo Research Incorporated, CA, USA)提取基因组DNA,基本操作遵照试剂盒说明书。

样本WZD202009保存在滤膜上,因此在使用试剂盒提取DNA之前先在超净工作台上用无菌剪刀将滤纸剪碎,全程无菌操作。由于WZD202009样本经过滤含鲸鱼粪便水样得到,为了保证基因组DNA浓度,在最后一步操作中仅加入50 μL洗脱缓冲液溶解DNA。

将提取到的DNA溶液进行0.8%琼脂糖凝胶电泳,评估所获得DNA的质量和浓度。DNA溶液4℃冰箱冷藏,用作下一步PCR扩增模板。

1.3 Cyt *b*和CO I 片段的PCR扩增和测序

本研究采用2种mtDNA分子标记(Cyt *b*和CO I)对提取得到的布氏鲸DNA样本进行PCR扩增和测序,所用引物由上海生工生物工程有限公司

合成。Cyt *b* 基因扩增引物两对, CBMYSTF1: 5'-CACATGGACTTCAACCATG-3' 和 CBMYSTR: 5'-CCTCAGATTCATTCGACTA-3'^[19], 以及 L14724: 5'-TGACTTGAARAACCAAYCGTTG-3' 和 H15387: 5'-GAATGGGATTATGTCTATGT-3'^[13]; CO I 基因扩增引物也采用两对, 分别是 COIF: 5'-GGTCAA CAAATCATAAAGATATTG-3' 和 COIR: 5'-TAAA CTTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'^[20], 以及 Lco1ea: 5'-TCGGCCATTTTACCTATGTTCATA-3' 和 Hbcuem: 5'-GGTGGCCGAAGAATCAGAATA-3'^[13]。PCR 反应体系和扩增条件参考相应文献。PCR 扩增反应在 ABI GeneAmp 9700 PCR 仪 (ABI, CA, USA) 上进行。

取 5 μ L PCR 产物经 1% 琼脂糖电泳检测, 之后用凝胶成像系统 (Gene Genius, Bio Imaging System) 照相并记录。对于扩增条带特异性较好的样本, 将剩余扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳, 切下 DNA 亮带, 用 PCR 产物纯化试剂盒 (上海赛百盛基因技术有限公司) 进行纯化。纯化产物交送武汉艾康健生物科技有限公司进行测序, 测序反应在 ABI 3730XL 测序仪 (Applied Biosystem 公司) 上完成, 测序引物与 PCR 扩增引物相同, 全部双向测序, 每个样品至少重复 3 次扩增和测序以确保序列准确性。

1.4 DNA 序列的拼接和比对

用 BioEdit 软件读取测序结果, 核对碱基和峰形

图以确保结果准确无误。使用 DNASTAR 软件包 (DNASTAR Inc., Madison, Wis.) 中的 SEQMAN 程序对同一样品的同一条基因序列进行排列和拼接, 并对照峰形图进行矫正。对于 Cyt *b* 和 CO I 基因序列, 均使用两对引物来确保准确性和序列长度, 使用 Clustal X 软件将同一样本的同目标准序列进行比对拼接, 并手动对序列进行编辑和整理。

1.5 物种鉴定

获得待鉴定物种 mtDNA 目的基因序列之后, 将基因序列提交 GenBank 并使用 BLAST 局部比对搜索工具 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 进行物种鉴定。此外, 为了确保鉴定结果准确性, 还将获得的 Cyt *b* 基因序列提交到专业的物种遗传鉴定网站 Surveillance DNA (<http://www.dna-surveillance.auckland.ac.nz/>), 选择须鲸物种参考数据库 (Witness for the Whale, Mysticetes Vs4.3) 进行物种鉴定^[21]; 将所获得的 CO I 基因序列提交至 BOLD SYSTEMS 生命条形码库 (<http://www.boldsystems.org/>) 进行物种匹配^[22]。

1.6 系统发育分析和线粒体单倍型分析

本研究下载须鲸科以及灰鲸科代表性物种的 Cyt *b* 和 CO I 序列, 包括小布氏鲸、布氏鲸、大村鲸、塞鲸 (*B. borealis*)、南极小须鲸 (*B. bonaerensis*)、小须鲸 (*B. acutorostrata*)、长须鲸 (*B. physalus*)、蓝鲸 (*B. musculus*)、座头鲸 (*Megaptera novaeangliae*)



图 1 本研究采集到粪便样品的两头活体布氏鲸 (照片来自张瑶瑶)

Fig. 1 Photos of the two living Bryde's whale from which fecal samples are collected for this study (Photos taken by Zhang Yao-Yao)

A. 样本 WZD202009 的背鳍; B. 样本 WZD202009 的头部背面观, 可见 3 条明显的脊线; C. 样本 WZD202009 的鲸须; D. 样本 WZD201911 的头部背面观, 可见 3 条明显的脊线

(A) dorsal fin (WZD202009); (B) dorsal view of the head with three prominent ridges (WZD202009); (C) lateral view of the baleen (WZD202009); (D) dorsal view of the head with three prominent ridges (WZD201911)

和灰鲸(*Eschrichtius robustus*), 侏儒露脊鲸(*Caperea marginate*)被用作外群, 用于构建系统发育树, 以辅助判断物种鉴定结果的可靠性。利用MEGA X^[23]软件进行多序列比对, 然后使用Kimura-2参数模型建立NJ树(Neighbor joining tree)^[24]和ML树(Maximum likelihood tree), Bootstrap重复1000次以估算各节点的置信度。

此外, 从GenBank中下载已发表的小布氏鲸的Cyt *b*和CO I 基因序列, 使用MEGA软件进行多序列比对, 并使用DnaSP软件(v5.10.1)^[25]确定单倍型种类。

2 结果

2.1 基因组DNA提取以及PCR扩增和测序结果

样本WZD201903和WZD201911被成功提取基因组DNA, Cyt *b*和CO I 基因片段均被成功扩增并测序。而从样本WZD202009提取的DNA质量不高, 无法用于PCR扩增, 两种分子标记均没有得到预期扩增产物。

经检验, 本研究分别使用两对引物扩增得到的Cyt *b*和CO I 目的片段一致, 仅在长度上有所不同, 均选择较长的片段用于后续分析。基于样本WZD201903得到的Cyt *b*和CO I 基因序列长度分别为680 和731 bp, 提交到GenBank, 登录号分别为MW984422和MW984423。基于样本WZD201911得到的Cyt *b*和CO I 基因序列分别为658 和671 bp, GenBank登录号分别为MW984420和MW984421。

2.2 遗传鉴定结果

用BLAST工具对本文获得的两个样品的四条mtDNA序列进行比对分析, 结果显示均与数据库中小布氏鲸序列高度匹配, 序列一致性高达99%—100%, 而与其他亲缘关系较近物种的序列一致性仅为93%—97%(表1和表2)。

将从样本WZD201903和WZD201911获得的Cyt *b*序列提交至Surveillance DNA网站进行物种鉴定。基于NJ树分析, 本研究所得到的Cyt *b*序列均与来自Kochi海域的小布氏鲸单倍型聚在一起, 置信度为100%, 两者遗传距离为0.00。该单倍型是编号为BedeJ0.HY的小布氏鲸。

来自WZD201903和WZD201911的CO I 序列在BOLD SYSTEMS物种水平上的匹配结果也与上述两种鉴定方法的结果相同。WZD201903的CO I 序列在BOLD SYSTEMS生命条形码库中的检索结果也与小布氏鲸(BOLD: AAI7662)序列完全匹配, 匹配个体在GenBank数据库中的登录号为GQ856370, 是一头来自印度洋的小布氏鲸。WZD-

表1 基于样本WZD201903所获得的2条mtDNA序列在GenBank中进行BLAST比对的鉴定结果

Tab. 1 GenBank BLAST results using the two mitochondrial DNA sequences obtained from the specimen WZD201903 in this study

基因标记 Gene maker	最接近物种, 序列和一致性 Closest species, sequences and similarity	其他邻近物种, 序列和一致性 Adjacent species, sequences and similarity
CO I	<i>B. edeni</i> (AB201258) (723/731) (99%)	<i>B. borealis</i> (AP006470) (700/731) (96%)
	<i>B. edeni</i> (JN190941) (655/655) (100%)	<i>B. brydei</i> (AB201259) (697/731) (95%)
	<i>B. edeni</i> (JN190944) (657/658) (99%)	<i>B. musculus</i> (MF409242) (680/731) (93%)
		<i>B. physalus</i> (KC572791) (678/730) (93%)
Cyt <i>b</i>	<i>B. edeni</i> (AB201258) (680/680) (100%)	<i>B. borealis</i> (MF409249) (658/680) (96%)
	<i>B. edeni</i> (MH844111) (650/650) (100%)	<i>B. brydei</i> (AB201259) (659/680) (96%)
		<i>B. physalus</i> (KC572855) (628/677) (93%)

表2 基于样本WZD201911所获得的2条mtDNA序列在GenBank中进行BLAST比对的鉴定结果

Tab. 2 GenBank BLAST results using the two mitochondrial DNA sequences obtained from the specimen WZD201911 in this study

基因标记 Gene maker	最接近物种, 序列和一致性 Closest species, sequences and similarity	其他邻近物种, 序列和一致性 Adjacent species, sequences and similarity
CO I	<i>B. edeni</i> (AB201258) (671/671) (100%)	<i>B. borealis</i> (AP006470) (642/671) (96%)
	<i>B. edeni</i> (JN190945) (655/655) (100%)	<i>B. brydei</i> (AB201259) (645/671) (96%)
	<i>B. edeni</i> (EU496283) (650/663) (98%)	<i>B. musculus</i> (MF409242) (627/671) (93%)
	<i>B. edeni</i> (MT895691) (625/626) (99%)	<i>B. physalus</i> (KC572791) (626/671) (93%)
Cyt <i>b</i>	<i>B. edeni</i> (MH844111) (656/658) (99%)	<i>B. borealis</i> (AP006470) (638/658) (97%)
	<i>B. edeni</i> (AB201258) (656/658) (99%)	<i>B. brydei</i> (AP006469) (638/658) (97%)
		<i>B. physalus</i> (KC572839) (609/658) (93%)

201911的CO I 序列在BOLD SYSTEMS 生命条形码库中的匹配结果也显示与小布氏鲸(BOLD: AAI-7662)完全匹配, 匹配个体在GenBank数据库中的登录号为JN190945, 来自印度洋的Kerala海岸。

2.3 系统发育分析结果

我们从GenBank中下载了须鲸科代表性物种的CO I 和Cyt *b*基因序列, 并与本研究所获得的布氏鲸序列一起使用MEGA X软件进行系统发育分析。从基于Cyt *b*基因序列(643 bp)构建得到的ML树可以看出, 本研究提交分析的两个样本的序列(WZD201903和WZD201911)与已发表的小布氏鲸聚集为一支, 并且与布氏鲸形成姊妹群, 而大村鲸则是更早分化形成的须鲸物种(图2)。基于CO I 和Cyt *b*基因序列构建的NJ树和ML树拓扑结

构相似, 因此我们仅提供基于Cyt *b*序列构建的ML树。

2.4 线粒体单倍型分析

本研究对13头小布氏鲸466 bp的CO I 序列进行了单倍型分析, 包括WZD201901、WZD201903、MW984418、AB201258、GQ856370、JN190944、JN190945、JN190946、MW571086、EU496283、MT895690、MT895691和MT895692。共检测到11个多态性位点, 定义4种mtDNA单倍型。其中EU496283为一种单倍型, MT895690、MT895691和MT895692共享一种单倍型, JN190944、JN190946和MW571086共享一种单倍型, 其余6头小布氏鲸共享一种单倍型。CO I 相关单倍型及样品信息见表3。

此外, 本研究还对7头小布氏鲸395 bp的Cyt *b*序列进行线粒体单倍型分析, 包括WZD201901、WZD201903、MW984417、AB201258、MH844111、KJ586849和EF057444。共检测到3种mtDNA单倍型, 其中KJ586849和EF057444各占一种单倍型, 其

余样本共享一种单倍型。Cyt *b*相关单倍型及样品信息见表3。

3 讨论

3.1 涠洲岛布氏鲸的物种鉴定

2019年首次证实在广西北部湾涠洲岛水域栖息有一个比较稳定的布氏鲸群体, 并且推测该海域可能是一个重要的布氏鲸摄食场^[7]。作者所在的研究团队长期在涠洲岛水域开展布氏鲸生态学研究, 目前已获取大量清晰的、适用于个体识别的照片。虽然绝大部分照片都能显示出布氏鲸独特的外观鉴别特征, 即上颌顶部有3条明显的脊线(图1)。然而, 由于小布氏鲸和布氏鲸外观极度相似, 并且在部分海域存在同域分布现象, 因此基于照片无法确定涠洲岛种群是小布氏鲸还是布氏鲸, 或者两种都有。虽然吴采雯等使用D-loop和Cyt *b*基因鉴定出涠洲岛水域2019年3月搁浅死亡的一头须鲸为小布氏鲸, 为该水域栖息的布氏鲸种群的物种识别提供了一些分子证据^[12]。但由于该研究仅鉴定了一

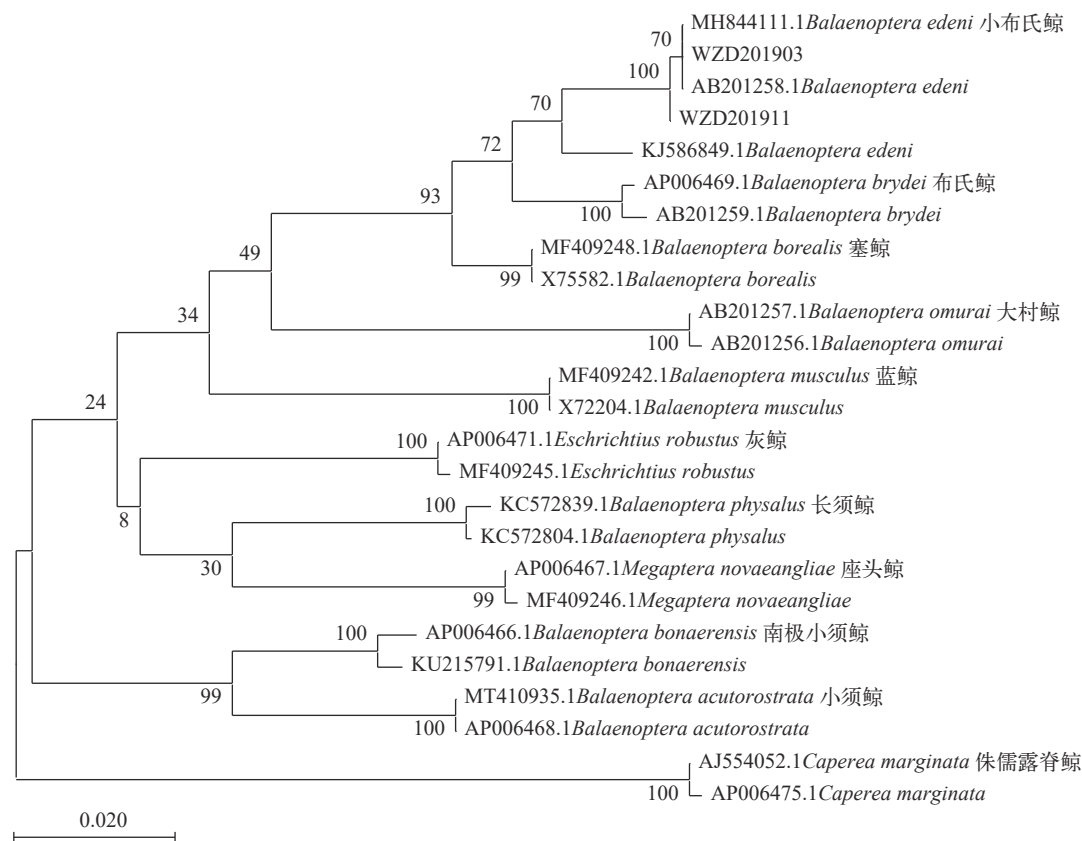


图2 基于Cyt *b*序列(643 bp)使用MEGA软件Kimura-2模型构建的ML系统发育树

Fig. 2 Maximum Likelihood phylogenetic tree constructed based on Cyt *b* (643 bp) gene sequences using the Kimura-2 parameter model in MEGA X

图中WZD201903和WZD201911为本研究所获得的Cyt *b*序列, 节点处的数值为1000次重复的Bootstrap值

WZD201903 and WZD201911 are the Cyt *b* sequences obtained in this study. Scale bar represents the evolutionary distance. Bootstrap values are shown at nodes

表 3 本研究分析的小布氏鲸线粒体单倍型
Tab. 3 Mitochondrial haplotypes of *B. edeni* analyzed in this study

CO I 序列 Sequences of CO I	地理来源 Geographic origin	单倍型 Haplotype
EU496283	大西洋西北部	Hap-1
MT895690	印度	
MT895691	印度	Hap-2
MT895692	印度	
JN190944	印度 Anchuthengu	Hap-3
JN190946	印度 Kollam	
MW571086	印度 Chirayinkil	
WZD201901	中国涠洲岛	Hap-4
WZD201903	中国涠洲岛	
MW984418	中国山东长岛	
AB201258	日本熊本	
JN190945	印度 Poonthura	
GQ856370	印度 Edayar	
Cyt b 序列 Sequences of Cyt b	地理来源 Geographic origin	单倍型 Haplotype
KJ586849	墨西哥湾	Hap-1
EF057444	印度 Cochin	Hap-2
WZD201901	中国涠洲岛	Hap-3
WZD201903	中国涠洲岛	
MW984417	中国山东长岛	
AB201258	日本熊本	
MH844111	中国涠洲岛	

头搁浅死亡的个体, 并且缺少活体采样印证, 因此尚不足以说明涠洲岛水域栖息的布氏鲸到底属于哪一类。经核实, 本研究采样并鉴定的2019年3月31日涠洲岛水域搁浅死亡的须鲸, 与吴采雯等^[12]2019年鉴定的须鲸为同一个体。本研究, 我们没能扩增得到这头须鲸的D-loop序列, 但得到了CO I 序列, 最终得到的鉴定结果与吴采雯等一致^[12]。

基于非损伤取样进行遗传分析已经成为濒危动物保护遗传学研究的重要方法之一^[14]。本研究采集得到涠洲岛栖息布氏鲸种群两个体的粪便样品(WZD201911和WZD202009), 提取基因组DNA, 从其中一份样品(WZD201911)顺利扩增、测序得到线粒体Cyt b和CO I 基因序列, 并利用这两个线粒体片段成功开展物种鉴定。最终, 通过BLAST、DNA Surveillance和BOLD等3种不同的遗传分析系统均鉴定该样品为小布氏鲸(表 1和图 2)。采用相同的方法, 我们还成功鉴定出涠洲岛海域2019年3月死亡的一头须鲸(WZD201903)也为小布氏鲸(表 2和图 2)。据此, 我们推测涠洲岛水域栖息的布氏鲸种群可能是小布氏鲸。然而, 鉴于北部湾北仑河口海域2019年1月曾经搁浅死亡一头大村鲸, 并

且稍后被分子鉴定确认^[12], 该地点距离涠洲岛仅约110 km。因此, 至于涠洲岛海域是否同域分布有大村鲸也还有待今后进一步对该群体扩大采样并开展遗传鉴定来证实。此外, 本研究基于线粒体Cyt b和CO I 基因序列开展的系统发育分析, 得到结果也支持布氏鲸和小布氏鲸应该划分为独立的物种, 而大村鲸则是更早分化形成的须鲸物种(图 2)^[3, 4]。本研究首次基于粪便样品收集并采用系列分子生物学实验技术和遗传分析手段, 成功开展涠洲岛栖息的活体布氏鲸的物种鉴定, 表明这种基于非损伤采样的物种鉴定方法值得今后推广应用。然而, 本研究通过粪便水样提取得到的DNA质量普遍不高, 样本WZD200911扩增得到线粒体Cyt b和CO I 基因序列片段, 但D-loop片段没有得到; 而从样本WZD202009提取的基因组DNA, 虽经过重复提取, 多次PCR扩增, 均未获得任何线粒体基因片段。据现场采样人员反映, 2019年11月观察到布氏鲸排便, 并且粪便呈团状漂浮在海面上, 等鲸游开后立即打捞并冷藏保存该粪便样品(WZD200911); 而2020年9月, 考察队员同样观察到布氏鲸排便, 但粪便很快分散在海水中, 等鲸鱼游开后, 才靠近排便现场, 采集并冷藏保存含粪便海水约1000 mL, 经抽滤得到样本WZD202009。由于样本WZD202009粪便浓度可能较低, 因此提取得到的DNA含量也极低, 导致无法扩增得到预期的线粒体DNA片段。因此, 本研究基于非损伤粪便采集的活体鲸类遗传鉴定方法还有待进一步改进和提升。建议今后考察过程中如果观察到鲸鱼排便现象, 在不干扰动物的前提下应迅速靠近排便现场, 快速收集含有高浓度粪便的水样, 并且最好能现场过滤并保存3 L以上水样。此外, DNA提取、PCR引物设计和扩增条件等实验环节也有待进一步优化, 甚至可以进一步发展建立一种基于环境DNA(Environmental DNA)的更灵敏、更高效的物种多样性监测技术^[26]。

3.2 后续研究和保护建议

本研究尝试开展小布氏鲸线粒体单倍型分析, 基于Cyt b和CO I 序列分别鉴定出3种和4种单倍型。通过分析涠洲岛小布氏鲸种群的CO I 序列, 发现它们与MW984417、AB201258和来自印度 Kerala海域的小布氏鲸(JN190945和GQ856370)具有相同的单倍型, 在BOLD系统上的匹配结果也指向来自印度的小布氏鲸, 据此我们推测涠洲岛小布氏鲸可能与印度的小布氏鲸群体存在较近的亲缘关系。然而, 目前已知的最邻近的布氏鲸种群在泰国湾上部^[8]。由于本研究所获得的样本量太少, 并且没能扩增得到遗传变异更高的D-loop序列, 因此尚不能推断涠洲岛栖息的小布氏鲸种群与国外其

他小布氏鲸种群之间的亲缘关系;也无法评估该种群的遗传多样性。建议今后加强对该种群的采样力度,深入开展种群遗传学分析,科学评估遗传多样性,并探索其迁徙规律以及来源等科学问题,为物种保护提供理论依据。

此外,研究表明全球布氏鲸种群可能面临的主要威胁包括船只碰撞、船舶噪声、勘测和开发所导致的生境破坏、分布范围的改变或萎缩、石油开采过程中发生的石油泄漏及海洋废弃物等^[27]。我们团队在涠洲岛水域开展布氏鲸调查过程中,发现很多个体身上存在明显的创伤,部分个体甚至出现背鳍缺失,推测很可能由船舶螺旋桨或者捕鱼网具造成,从而提醒我们应该重视并加强对该种群的保护^[28]。

综上所述,本研究采集得到涠洲岛布氏鲸种群两个体的粪便样品,提取基因组DNA,从其中一份样品成功扩增并测序得到线粒体Cyt b和CO I 两个基因序列片段,基于这两个基因片段采用了3种不同的遗传分析系统开展物种鉴定,鉴定结果均为小布氏鲸。此外,采用相同的分析方法,本研究还鉴定出涠洲岛海域同年死亡的一头须鲸也为小布氏鲸。据此,我们推测涠洲岛水域栖息的布氏鲸种群可能是小布氏鲸。本研究首次基于粪便样品采用分子生物学技术成功开展活体布氏鲸的物种鉴定,这种基于非损伤采样的研究方法值得进一步优化并推广应用。建议今后进一步深入开展涠洲岛布氏鲸的种群遗传学研究,为物种保护提供科学依据。

致谢:

感谢广西科学院农志文、李冰琳及志愿者提供采样帮助,感谢美国盖特威科技大学Richard William McLaughlin教授帮助修订英文摘要。

参考文献:

- [1] Kato H, Perrin W F. Bryde's Whales *Balaenoptera edeni/brydei* [A]//Perrin W F, Würsig B, Thewissen J G M (Eds.), Encyclopedia of Marine Mammals [M]. Academic Press, Amsterdam. 2009: 158-163.
- [2] Wang P L. Chinese Cetaceans [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2012: 57-67. [王丕烈. 中国鲸类 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2012: 57-67.]
- [3] Wada S, Oishi M, Yamada T K. A newly discovered species of living baleen whale [J]. *Nature*, 2003, **426**(6964): 278-281.
- [4] Sasaki T, Nikaido M, Wada S, et al. *Balaenoptera omurai* is a newly discovered baleen whale that represents an ancient evolutionary lineage [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2006, **41**(1): 40-52.
- [5] Rosel P E, Wilcox L A, Yamada T K, et al. A new species of baleen whale (*Balaenoptera*) from the Gulf of Mexico, with a review of its geographic distribution [J]. *Marine Mammal Science*, 2021, **37**(2): 577-610.
- [6] Liu M, Lin M, Li S. Species diversity and spatiotemporal patterns based on cetacean stranding records in China, 1950-2018 [J]. *Science of the Total Environment*, 2022(822): 153651.
- [7] Chen M, Huang S L, Wu H, et al. Occurrence of Bryde's whales, *Balaenoptera edeni*, in the northern Beibu Gulf, China [J]. *Marine Mammal Science*, 2019, **35**(4): 1643-1652.
- [8] Iwata T, Akamatsu T, Thongsukdee S, et al. Tread-water feeding of Bryde's whales [J]. *Current Biology*, 2017, **27**(21): R1154-R1155.
- [9] Chen B, Zhu L, Jefferson T A, et al. Coastal Bryde's whales' (*Balaenoptera edeni*) foraging area near Weizhou Island in the Beibu Gulf [J]. *Aquatic Mammals*, 2019, **45**(3): 274-279.
- [10] Liu M, Lin W, Lin M, et al. The first attempt of satellite tracking on occurrence and migration of Bryde's whale (*Balaenoptera edeni*) in the Beibu Gulf [J]. *Journal of Marine Science and Engineering*, 2021, **9**(8): 796.
- [11] Wang Z T, Duan P X, Chen M, et al. Vocalization of Bryde's whales (*Balaenoptera edeni*) in the Beibu Gulf, China [J]. *Marine Mammal Science*, 2022, (38): 1118-1139.
- [12] Wu C W, Jiang H P, Zhang D, et al. The finding of a Bryde's whale with abnormal upper jaw and baleen near Weizhou Island in the Beibu Gulf: implication for conservation [J]. *Acta Theriologica Sinica*, 2020, **40**(4): 329-336. [吴采雯, 江慧萍, 张迪, 等. 北部湾涠洲岛水域发现上颌和须板异常的布氏鲸: 对保护的启示 [J]. 兽类学报, 2020, **40**(4): 329-336.]
- [13] Zhao L, Zhong M, Wu F, et al. First record of Omura's whale (*Balaenoptera omurai*) in the Beibu Gulf, China [J]. *Aquatic Mammals*, 2020, **46**(3): 301-306.
- [14] Kohn M H, Wayne R K. Facts from feces revisited [J]. *Trends in Ecology & Evolution*, 1997, **12**(6): 223-227.
- [15] Wang J, Su W, Nie W, et al. Establishment and characterization of fibroblast cell lines from the skin of the Yangtze finless porpoise [J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 2011, **47**(9): 618-630.
- [16] Wang J Z, Ji W, Xiao W H, et al. A preliminary study of cell culture *in vitro* derived from Yangtze finless porpoise umbilical vein [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2010, **34**(2): 436-441. [王京真, 姬伟, 肖武汉, 等. 长江江豚脐静脉细胞体外培养的初步研究 [J]. 水生生物学报, 2010, **34**(2): 436-441.]
- [17] Yu X Y, Yang F, Zhu J M, et al. The development of *in vitro* models and their applications in cetacean research [J]. *Acta Theriologica Sinica*, 2018, **38**(6): 597-607. [于学颖, 杨峰, 朱静敏, 等. 体外模型的发展及其在鲸豚研究中的应用 [J]. 兽类学报, 2018, **38**(6): 597-607.]
- [18] Zhu L. Studies on the major histocompatibility complex class II of giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*) [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2006: 25-29. [朱亮. 大熊猫主要组织相容性复合体 II 类基因研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2006: 25-29.]
- [19] Ma M, Zhu Q, Li X, et al. Identification of *Balaenoptera*

- omurai* from an unknown whale vertebra based on Cyt *b* gene sequence [J]. *Acta Theriologica Sinica*, 2007, **27**(3): 288-292. [马牧, 祝茜, 李响, 等. 利用Cyt *b*基因由未知鲸骨鉴定出大村鲸 [J]. *兽类学报*, 2007, **27**(3): 288-292.]
- [20] Folmer O, Black M, Hoeh W, *et al.* DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates [J]. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 1994, **3**(5): 294-299.
- [21] Ross H A, Lento G M, Dalebout M L, *et al.* DNA surveillance: web-based molecular identification of whales, dolphins, and porpoises [J]. *Journal of Heredity*, 2003, **94**(2): 111-114.
- [22] Hebert P D N, Cywinska A, Ball S L, *et al.* Biological identifications through DNA barcodes [J]. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2003, **270**(1512): 313-321.
- [23] Tamura K, Stecher G, Peterson D, *et al.* MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0 [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2013, **30**(12): 2725-2729.
- [24] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 1987, **4**(4): 406-425.
- [25] Librado P, Rozas J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data [J]. *Bioinformatics*, 2009, **25**(11): 1451-1452.
- [26] Rees H C, Maddison B C, Middleditch D J, *et al.* The detection of aquatic animal species using environmental DNA - a review of eDNA as a survey tool in ecology [J]. *Journal of Applied Ecology*, 2014, **51**(5): 1450-1459.
- [27] Rosel P E, Corkeron P J, Engleby L, *et al.* Status review of Bryde's whales (*Balaenoptera edeni*) in the Gulf of Mexico under the Endangered Species Act (NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC-692) [R]. U. S. Department of Commerce, 2016.
- [28] Zhang Y Y. Habitat use and health assessment of Bryde's whales around Weizhou island [D]. Beijing: University of Chinese Academy of Sciences, 2021: 40-41. [张瑶瑶. 涠洲岛布氏鲸种群栖息地利用现状及健康状况评估 [D]. 北京: 中国科学院大学, 2021: 40-41.]

A PILOT STUDY ON SPECIES IDENTIFICATION OF BRYDE'S WHALES INHABITING IN THE WEIZHOU ISLAND WATERS, BEIBU GULF

HE Rui-Lin^{1,2}, CHEN Mo³, ZHANG Yao-Yao¹, MEI Zhi-Gang^{1,4}, FAN Fei^{1,4},
WANG Ding^{1,4} and ZHENG Jin-Song^{1,4}

(1. Key Laboratory of Aquatic Biodiversity and Conservation of the Chinese Academy of Sciences; Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. Guangxi Hydrobiology Joint Laboratory, Guangxi Academy of Sciences, Nanning 530007, China; 4. National Aquatic Biological Resource Center, Wuhan 430072, China)

Abstract: The Bryde's whale is a medium sized baleen whale that is widely distributed in the tropical and subtropical waters. However, the taxonomy of the Bryde's whale has long been controversial. Currently, both the IUCN (the International Union for Conservation of Nature and Natural Resources), and the IWC (the International Whaling Commission) assign the whale as two subspecies, *Balaenoptera edeni edeni* and *B. e. brydei*. Although, several studies indicate that they should be regarded as two separate species, *B. e. edeni* and *B. e. brydei* are so similar in their external morphology, and are sometimes sympatric, which make it is difficult to correctly identify them in the field just through observation. Therefore, accurate species delimitation usually requires molecular methods. Recently, a Bryde's whale population was reported inhabiting in the Weizhou Island waters, Beibu Gulf. However, it is unclear which species these animals belong to. In this study, we collected two fecal samples from two individuals in this population, and tried to identify them using molecular methods. Genomic DNA was extracted from one of the two fecal samples. Fragments of the mitochondrial genes Cyt *b* and CO I were PCR amplified and sequenced. Based on the mitochondrial gene sequences, the whale was identified as *B. e. edeni*. In addition, a baleen whale that died in 2019 in the same waters was also identified as *B. e. edeni* using the same methods outline in this study. Thus, we infer that the population living in the Weizhou Island waters is *B. e. edeni*. This is the first study which successfully identified a living Bryde's whale based on mitochondrial DNA present in fecal samples. This non-invasive sampling-based species identification method should be further developed and applied in the future. Additional studies, such as population genetics should be carried out to provide a scientific basis for the conservation of this Bryde's whale population.

Key words: Species identification; Non-invasive sampling; Cyt *b*; CO I ; Beibu Gulf; *Balaenoptera edeni*