

鲸类 *c - mos* 基因的序列变异性及在系统发生分析中应用的初步研究

杨 光¹ 季国庆¹ 周开亚¹ 魏辅文²

(1 南京师范大学生命科学学院遗传资源研究所, 南京, 210097)

(2 中国科学院动物研究所, 北京, 100080)

摘要: 通过猪等的 *c - mos* 基因保守区序列设计了用于扩增鲸类 *c - mos* 基因的引物。应用此引物扩增并测定了齿鲸类 5 个科 12 个种 546 bp 的 *c - mos* 基因编码区序列。结果表明鲸类的 *c - mos* 基因遗传变异水平较低。在系统发生重建中, 同科的物种聚为单系, 但不能很好地解决科下亚科间的关系, 提示 *c - mos* 基因仅适于鲸类科级以上阶元的系统发生研究。

关键词: 鲸类; *C - mos* 基因; 变异; 系统发生

中图分类号: Q953 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000 - 1050 (2003) 04 - 0277 - 06

A Preliminary Study on the Sequence Variability of Cetacean *c - mos* Genes and its Application in Phylogenetic Analysis

YANG Guang¹ JI Guoqing¹ ZHOU Kaiya¹ WEI Fuwen²

(1 College of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

(2 Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract: Primers for amplifying the cetacean *c - mos* genes were designed based on the alignment of conservative region of *c - mos* genes from pigs and some other mammals. With these primers, the partial coding region of cetacean *c - mos* gene, which was 546 base pairs (bp) in length, was amplified by using polymerase chain reaction (PCR) for 23 toothed whales belonging to 12 species of five families. The amplified products were purified and directly sequenced by an ABI 310 automated genetic analyzer. The results suggested a very low level of sequence variation at cetacean *c - mos* genes. In the phylogenetic analysis using maximum likelihood method incorporated in computer software PHYLIP, species from the same family constituted respective monophyletic groups, but the relationship at subfamily level was not well resolved. This suggested that *c - mos* gene is an appropriate candidate in the phylogenetic study only at family and/or higher level.

Key words: Cetaceans; *C - mos* gene; Variability; Phylogeny

近年来, 随着分子生物学技术的发展, 分子 (特别是 DNA 分子) 数据正越来越多地应用到鲸类生物学研究中。依据 DNA 分子数据, 结合支序分类学方法来研究鲸类的分类、进化和系统发生, 已经取得了一系列成果, 但同时也存在一些争议^[1-6], 因此仍需要使用更多的分子标记技术, 特别是核基因组中的分子标记进行研究。*c - mos* 基因是病毒鼠源肉瘤病毒 (Murine sarcoma virus,

MOS) 的一种胞内同源物。其编码产物 MOS 在脊椎动物和无脊椎动物卵母细胞减数分裂中起关键的协调作用^[7]。*c - mos* 基因在核基因组内为单拷贝, 无内元, 无重复序列, 全长约 1 kb 左右, 适用于系统发生分析^[8]。Saint 等^[9]通过 *c - mos* 部分序列, 探讨了爬行动物有鳞类高级阶元的系统发生关系, 并与形态学数据的分析结果进行比较, 认为此基因对有鳞目内科级阶元的系统发生分析是非常有用的。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30270212, 30070116 和 39800014); 国家自然科学基金杰出青年基金资助项目 (30125006); 江苏省“青蓝工程”中青年学术带头人科研基金和国家“211 工程”“十五”建设项目

作者简介: 杨光 (1968 -), 男, 博士, 教授, 主要从事动物生态学、生态遗传学和保护研究。

收稿日期: 2002 - 11 - 22; 修回日期: 2003 - 05 - 28

此外, *c - mos* 基因在爬行类主要类群间, 以及壁虎类和鸟类等的系统发生研究中得到应用^[10-12]。但迄今为止, 尚没有应用此基因进行鲸类系统发生研究的报道。本研究设计引物首次扩增并测定了鲸类的 *c - mos* 基因编码区的部分序列, 目的在于初步探讨鲸类 *c - mos* 基因的变异性及其在系统发生分析中的应用。

1 材料与方法

1.1 样品

所用标本为渔业误捕误伤致死的个体, 分属于齿鲸类 5 个科 12 个种, 其中 8 号标本为骨骼样品, 15 号标本为用酒精浸泡或冷冻保存的肌肉样品(表 1)。

1.2 基因组 DNA 提取

通过标准的蛋白酶 K 消化和酚/氯仿抽提的方法^[13]提取酒精或冰冻保存组织的总 DNA。对骨骼样品的处理参照季国庆等^[14]的方法。

表 1 研究用样品

Table 1 Samples used in this study					
种名 Species	科名 Family	样本数 Sample size	组织材料 Tissue	采集地点 Sampling location	采集时间 Sampling time
恒河豚 <i>Platanista gangetica</i>	恒河豚科 Platanistidae	2	肌肉 Muscle	孟加拉国达卡附近的 Gangs - Brahmaputra 河	1997. 01
弗西豚 <i>Pontoporia blainvillei</i>	弗西豚科 Pontoporiidae	2	肌肉 Muscle	阿根廷沿岸 Coastal Argentina	1997. 01 ~ 02
白鲸 <i>Lipotes vexillifer</i>	白鲸科 Lipotidae	2	肌肉 Muscle	长江下游 The lower reaches of the Yangtze River	
瓶鼻海豚 <i>Tursiops truncatus</i>	海豚科 Delphinidae	2	骨骼 Skeleton	浙江舟山 Zhoushan, Zhejiang Province	1984. 11
南瓶鼻海豚 <i>T. aduncus</i>	海豚科 Delphinidae	2	骨骼 Skeleton	福建东山 Dongshan, Fujian Province	1998. 10
中华白海豚 <i>Sousa chinensis</i>	海豚科 Delphinidae	2	肌肉 Muscle	广西北海 Beihai, Guangxi Autonomous Region	2000. 11
条纹原海豚 <i>Stenella coeruleoalba</i>	海豚科 Delphinidae	2	骨骼 Skeleton	福建东山 Dongshan, Fujian Province	1998. 12
长喙真海豚 <i>Delphinus capensis</i>	海豚科 Delphinidae	2	骨骼 Skeleton	广西北海 Beihai, Guangxi Autonomous Region	1987. 04
里氏海豚 <i>Grampus griseus</i>	海豚科 Delphinidae	1	肌肉 Muscle	福建东山 Dongshan, Fujian Province	1998. 12
江豚 <i>Neophocaena phocaenoides</i>	鼠豚科 Phocoenidae	2	肌肉 Muscle	福建东山 Dongshan, Fujian Province	1998. 12
港湾鼠豚 <i>Phocoena phocoena</i>	鼠豚科 Phocoenidae	2	肌肉 Muscle	美国西南渔业科学中心提供 Presented by SWFSC of USA	1998. 08 ~ 09
拟鼠豚 <i>Phocoenoides dalli</i>	鼠豚科 Phocoenidae	2	肌肉 Muscle	美国西南渔业科学中心提供 Presented by SWFSC of USA	1996. 12

1.3 引物设计、PCR 扩增和序列测定

引物设计: 根据人 (*Homo sapiens*)、猴子 (*Cercopithecus aethiops*)、大鼠 (*Rattus norvegicus*)、小鼠 (*Mus musculus*) 和猪 (*Sus scrofa*) 的 *c - mos* 基因序列 (Genbank) 号 (J00119、X12449、X00422、J00372 和 X78318) 的保守区设计出扩增鲸类 *c - mos* 基因编码区部分片段引物 DCM1 (5' - TGG CCT GGT GCT CAA TAG ACT GG - 3') 和 DCM2 (5' - AGG GTG ATG GCA AAG GAG TAG ATG TC - 3'), 扩增产物的长度约 649 bp。在 DCM1 和 DCM2 之间又设计了引物 DCM3 (5' - CGG CGC TCG GTG GGT GTA - 3'), DCM3 与 DCM1 配对作为二次巢式 PCR 的引物, 巢式 PCR 的产物约 587 bp。引物由上海生工生物工程技术有限公司

合成。使用巢式 PCR 的目的是为了增加反应的特异性。通过随后对扩增产物的序列测定及 BLAST 搜索, 显示本研究获得的序列与有蹄类的 *c - mos* 基因具有明显较高的相似性, 证实所获得的序列的确来自鲸类的 *c - mos* 基因。

PCR 扩增反应体系: 10 μM 的两条引物 (DCM1 和 DCM2) 各 1 μl, 2 mM 的 dNTP 2 μl (上海生工公司), 25 mM 的 Mg²⁺ 2 μl, 1 mg/ml 牛血清白蛋白 (BSA) 2 μl (Biotech 公司), PCR buffer 3 μl, 5 U/μl 的 Taq 酶 0.2 μl, 模板 1 ~ 5 μl, 加 ddH₂O 补足到 30 μl。PCR 反应试剂盒购自 Promega。一次 PCR 产物稀释 10 倍后取 2 μl 作为二次巢式 PCR 的模板。

PCR 循环条件: 由于骨骼样品 DNA 的质量较

差,即使使用了巢式 PCR,大多数情况下也可能会有非特异的扩增产物出现,或者在琼脂糖凝胶上表现为拖尾(Smear)。为此,我们在第一次 PCR 时采用了降落 PCR (Touchdown PCR) 的循环条件。降落 PCR 循环参数为:预变性 94 5min;循环 1~15 为 95 变性 30 s,62 复性 30 s,72 延伸 50 s,其中每个循环复性温度降 0.3 ;循环 16~40 为 95 变性 30 s,54 复性 30 s,72 延伸 50 s;最后 72 补齐 7 min。在随后的二次巢式 PCR 中,所使用的循环参数与常规 PCR 的循环参数基本相同,只是复性温度比第一次 PCR 的第 16~40 个循环的复性温度提高 2~4 以增加产物的特异性,循环次数为 30。

PCR 产物直接经纯化试剂盒(上海华舜生物工程有限公司)纯化后作为测序的模板,在本实验室的 310 型全自动遗传分析仪(Applied Biosystem Inc.)上进行序列测定。测序引物为 DCM1。具体操作参照相应的用户手册。

1.4 数据分析

序列结果用 Clustal X 软件^[15]进行比对,并辅以人工校对确定变异位点。使用 MEGA 软件^[16]计算出个体间核苷酸的转换数和颠换数,给出密码子各位点上的变异图。把核苷酸序列转换成氨基酸序列,计算同义替换数和非同义替换数,统计氨基酸的变异位点。以猪的同源序列为外类群,重建鲸类不同类群的系统发生关系。用 PHYLIP 软件^[17]中的最大似然法(Maximum likelihood, ML)构建系统树。通过自引导检验(bootstrapping)获得系统树分支的置信

度,重复次数为 100 次。

2 结果

共获得齿鲸类 5 个科 12 个种共 23 个个体 546 bp 的序列。通过 BLAST 搜索显示这些序列与有蹄类的 *c-mos* 基因序列有显著的同源性,说明本研究得到的序列的确来自鲸类 *c-mos* 基因。这些序列已存入 Genbank,查询号为 AY178277 - AY178288。共发现 32 个变异位点,其中发生在氨基酸密码子第 1、2 和 3 位的分别为 5、8 和 19 个(图 1)。鲸类不同种间的碱基替换数最高为 17,颠换最高为 5(表 2)。海豚科内海豚亚科的长喙真海豚、条纹原海豚、瓶鼻海豚、南瓶鼻海豚和中华白海豚个体间除长喙真海豚存在 1 个位点的颠换差异外,未发现任何变异(图 1)。鼠豚科的拟鼠豚和港湾鼠豚的序列也完全相同。海豚科内属于领航鲸亚科的里氏海豚与海豚亚科差异也很小,仅为两个颠换和 1 个转换。科间的碱基替换则以弗氏海豚科与海豚科间最高,平均为 15.38,颠换则在恒河豚科与鼠海豚科及白鲸豚科之间最高,平均为 5(表 3)。546 bp 的序列共编码了 182 个氨基酸,有 14 个核苷酸位点的变异导致了氨基酸组成的改变,而另外 18 个位点则为同义替换(图 2)。位点见图 2。海豚科的条纹原海豚、瓶鼻海豚、南瓶鼻海豚和中华白海豚的氨基酸序列完全相同。同样,鼠豚科的 3 个种,即拟鼠豚、港湾鼠豚和江豚的氨基酸序列也完全相同。

密码子位点 Codon positions	3322233313	1333323313	3122132332	33
变异位点 Variable sites	111111	2222233333	3333344555	55
	3379112359	0126901124	4568949000	12
	3648670242	5021482582	5820114179	35
长喙真海豚 <i>Delphinus capensis</i>	CCTGGGACAA	CCCCAGGGG	GGATTCATT	CC
条纹原海豚 <i>Stenella coeruleoalba</i>C.....	..
瓶鼻海豚 <i>Tursiops truncatus</i>C.....	..
南瓶鼻海豚 <i>T. aduncus</i>C.....	..
中华白海豚 <i>Sousa chinensis</i>C.....	..
里氏海豚 <i>Grampus griseus</i>	..C...T..C.....	..
拟鼠豚 <i>Phocoenoides dalli</i>	...A.CG.GC.C.CTGC	..
港湾鼠豚 <i>Phocoena phocoena</i>	...A.CG.GC.C.CTGC	..
江豚 <i>Neophocaena phocaenoides</i>	...A.CG.GC.C.CTGC	..
白鲸豚 <i>Lipotes vexillifer</i>G.GT....	.C...CTG C	C.
恒河豚 <i>Platanista gangetica</i>	.G...G.G	A.TT.CAA.	TC.TCTG.	..
弗氏海豚 <i>Pontoporia blainvillei</i>	TT.C.G GG	.AT..G..A	.CG.CTG.	.T

图 1 鲸类 *c-mos* 基因编码区变异位点图

Fig. 1 Variable sites in partial coding sequences of cetacean *c-mos* genes

变异位点的数字从测序引物 DCM1 后第一个碱基开始

Number of variable sites starts from the first base following sequencing primer DCM1

	变异位点	Variable sites
	11111	1111
	2335600122	2367
	5392934001	7150
长喙真海豚 <i>Delphinus capensis</i>	VSRIRDQAVK	VLAV
条纹原海豚 <i>Stenella coeruleoalba</i>L.
瓶鼻海豚 <i>Tursiops truncatus</i>L.
南瓶鼻海豚 <i>T. aduncus</i>L.
中华白海豚 <i>Sousa chinensis</i>L.
里氏海豚 <i>Grampus griseus</i>	A.....L.
拟鼠豚 <i>Phocoenoides dalli</i>	.N.....L.	A. V.
港湾鼠豚 <i>Phocoena phocoena</i>	.N.....L.	A. V.
江豚 <i>Neophocaena phocaenoides</i>	.N.....L.	A. V.
白 ^髯 豚 <i>Lipotes vexillifer</i>L.	.. VA
恒河豚 <i>Platanista gangetica</i>S. HIL.	. FV.
弗氏海豚 <i>Pontoporia blainvillei</i>	.. PV. G. LR	.. V.

图2 鲸类 c - mos 基因的氨基酸变异位点图

Fig. 2 Variable sites in amino acid sequences of cetacean c - mos genes

变异位点数字从测序引物 DCM1 后第一个氨基酸开始

Number of variable sites starts from the first amino acid following sequencing primer DCM1

通过 ML 法构建的系统发生树 (图 3) 中, 海豚科的物种 (长喙真海豚、里氏海豚、条纹原海豚、瓶鼻海豚、南瓶鼻海豚和中华白海豚, 以及鼠豚科的物种 (江豚、拟鼠豚和港湾鼠豚) 分别组成

单系, 且均具有较高的自引导值。3 个淡水豚科中, 恒河豚构成系统树最基部的分支, 其次是弗氏海豚, 白^髯豚与鼠豚科组成姊妹群, 但后者的置信度较低 (仅为 30)。

表2 鲸类种间 c - mos 基因序列的转换数/颠换数

Table 2 Numbers of transitions/transversions among cetacean c - mos genes

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1 长喙真海豚 <i>Delphinus capensis</i>											
2 条纹原海豚 <i>Stenella coeruleoalba</i>	0/1										
3 瓶鼻海豚 <i>Tursiops truncatus</i>	0/1	0/0									
4 南瓶鼻海豚 <i>T. aduncus</i>	0/1	0/0	0/0								
5 中华白海豚 <i>Sousa chinensis</i>	0/1	0/0	0/0	0/0							
6 里氏海豚 <i>Grampus griseus</i>	2/1	2/0	2/0	2/0	2/0						
7 拟鼠豚 <i>Phocoenoides dalli</i>	8/2	8/1	8/1	8/1	8/1	10/1					
8 港湾鼠豚 <i>Phocoena phocoena</i>	8/2	8/1	8/1	8/1	8/1	10/1	0/0				
9 江豚 <i>Neophocaena phocaenoides</i>	7/2	7/1	7/1	7/1	7/1	9/1	1/0	1/0			
10 白 ^髯 豚 <i>Lipotes vexillifer</i>	7/2	7/1	7/1	7/1	7/1	9/1	5/2	5/2	4/2		
11 恒河豚 <i>Platanista gangetica</i>	10/5	10/4	10/4	10/4	10/4	12/4	8/5	8/5	7/5	7/5	
12 弗氏海豚 <i>Pontoporia blainvillei</i>	14/2	14/1	14/1	14/1	14/1	16/1	12/2	12/2	11/2	11/2	11/5

表3 几个鲸类科间 c - mos 基因序列的转换数/颠换数

Table 3 Numbers of transitions/transversions of c - mos gene sequences among cetacean families

	1	2	3	4
1 海豚科 Delphinidae				
2 鼠豚科 Phocoenidae	7.92/1.13			
3 白 ^髯 豚科 Lipotidae	7.25/1.13	4.67/2.00		
4 恒河豚科 Platanistidae	10.25/4.13	7.67/5.00	7/5	
5 弗西豚科 Pontoporiidae	14.25/1.13	11.67/2.00	11/2	11/5

3 讨论

本研究显示, *c-mos* 基因在鲸类种内不同个体间没有发现任何变异, 科内不同种间的变异水平也较低。如海豚亚科的长喙真海豚、条纹原海豚、瓶鼻海豚、南瓶鼻海豚和中华白海豚, 除长喙真海豚存在 1 个位点的颠换外, 其余 4 个种的序列完全相同; 鼠豚科的江豚、港湾鼠豚和拟鼠豚之间也仅有 1 个位点的序列差异, 且该位点的变异并未导致氨基酸组成的改变。上述变异水平要明显低于其它动物类群的 *c-mos* 基因。如 Saint 等扩增并测定了爬行动物有鳞类的 *c-mos* 基因 375 bp 的序列, 共发现 237 个变异位点, 变异位点占分析位点的 63.2%^[19]。而本研究却在 5 个科 12 个物种 546 bp 的序列中只发现 32 个变异位点, 仅占 5.86%, 远远小于有鳞类。为什么鲸类的 *c-mos* 基因如此保守? 我们推测可能与鲸类长期生活于海洋环境有关。海洋环境相对于陆地来说比较单一和稳定, 使得其基因组面临着较小的选择压力, 相应地基因的分化水平较低。这种情况在鲸类其它基因系统(如与免疫适应相关的主要组织相容性复合体(Major histocompatibility complex, MHC)中也存在^[18,19]。实际上, 鲸类 mtDNA 控制区(Control region) 每百万年 0.5%~1% 的进化速率^[20,21] 与其它哺乳动物相比, 也是比较低的。

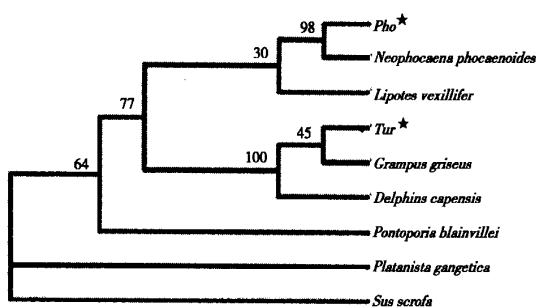


图 3 鲸类 *c-mos* 基因的最大似然树

Fig. 3 Maximum likelihood tree of cetacean *c-mos* genes

Tur * 包括瓶鼻海豚、南瓶鼻海豚、中华白海豚和条纹原海豚。

Pho * 包括港湾鼠豚和拟鼠豚。

Pho *: *Phocoena phocoena*, *Phocoenoides dalli*; Tur *: *Tursiops truncatus*, *T. aduncus*, *Sousa chinensis*, *Stenella coeruleoalba*

系统发生树中, 海豚科及鼠豚科都以较高的自引导值聚为一单系, 这与 Arnason 等^[6] 及 Yang 等^[22] 中所有总科及科级阶元都聚为单系的观点是吻合

的。虽然在不同的系统树中, 3 种淡水豚类(白暨豚、弗氏海豚和恒河豚) 的系统发生位置有所不同, 但相互之间均没有直接的亲缘关系, 这也与目前广泛接受的淡水豚类是非单系发生的观点^[22,23] 是一致的。恒河豚构成系统树中最基部的分支, 这与恒河豚从淡水豚类中最早分化出来的观点^[6,22] 相符, 但弗氏海豚的系统发生位置和白暨豚组成鼠豚科的姊妹群等, 则又与以前的研究结果^[6,22-25] 不一致。这种差别一方面可能与 *c-mos* 基因在鲸类中变异水平较低, 相应地可用于系统发生分析的信息较少有关。同时也可能与不同基因, 特别是核 DNA 基因和 mtDNA 基因可能遵循不同的进化方式和速率有关。

虽然鲸类的 *c-mos* 基因分化程度较低, 变异水平较小, 但重建的系统发生树中, 同科(如海豚科和鼠豚科) 的不同种都组成单系。而在科下的亚科之间, 海豚科内不同亚科则没有组成各自独立的单系。因此, 我们认为, *c-mos* 基因在鲸类的系统发生研究中可能不适合科以下(属、种等) 的分类阶元。对此, 我们还将开展进一步的研究。

参考文献:

- [1] Gaur D, Higgins D G. Molecular evidence for the inclusion of cetaceans within the order Artiodactyla [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 1994, **11**: 357 - 364.
- [2] Nikaido M, Rooney A P, Okada N. Evolution Phylogenetic relationships among cetartiodactyls based on insertions of short and long interspersed elements: Hippopotamuses are the closest extant relatives of whales [J]. *Proceeding of National Academy of Science of USA*, 1999, **96**: 10 261 - 10 266
- [3] Milinkovitch M C, Meyer A, Powell J R. Phylogeny of all major groups of cetaceans based on DNA sequences from three mitochondrial genes [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 1994, **11**: 939 - 948.
- [4] Milinkovitch M C, Leduc R G, Adachi J, Farnir F., Georges M., Hasegawa M. Effects of character weighting and species sampling on phylogeny reconstruction: A case study based on DNA sequence data in cetaceans [J]. *Genetics*, 1996, **144**: 1 817 - 1 833.
- [5] Arnason U, Gullberg A. Relationship of baleen whales established by cytochrome b gene sequence comparison [J]. *Nature*, 1994, **367**: 726 - 728.
- [6] Arnason, U, Gullberg A. Cytochrome b gene nucleotide sequences and identification of five primary lineages of extant cetaceans [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 1996, **13**: 407 - 417.

- [7] Yew N, Strobel M, Vandewoude G F. Mos and the cell cycle: The molecular basis of the transformed phenotype [J]. *Current Opinion in Genetics and Development*, 1993, **3**: 19 - 25.
- [8] Sagata N, Oskarsson M, Copeland T, Brumbaugh J, Vandewoude G F. Function of *c-mos* proto-oncogene product in meiotic maturation in *Xenopus* oocytes [J]. *Nature*, 1988, **335**: 519 - 525.
- [9] Saint KM, Austin C C, Donnellan S C, Hutchison MN. *C-mos*, a nuclear marker useful for squamate phylogenetic analysis [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 1998, **10**: 259 - 263.
- [10] Hedges S B, Poling L L. A molecular phylogeny of reptiles [J]. *Science*, 1999, **283**: 998 - 1 001.
- [11] Donnellan S C, Hutchinson M N, Saint K M. Molecular evidence for the phylogeny of Australian gekkonoid lizards [J]. *Biological Journal of Linnean Society of London*, 1999, **67**: 97 - 118.
- [12] Cooper A, Penny D. Mass survival of birds across the Cretaceous - Tertiary boundary: molecular evidence [J]. *Science*, 1997, **275**: 1 109 - 1 113.
- [13] Sambrook J, Fitch E, Maniatis T. Molecular cloning, a laboratory manual [M]. Second edition. USA: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989.
- [14] 季国庆, 杨光, 刘珊, 周开亚. 中国水域瓶鼻海豚的 mtDNA 控制区序列变异性分析 [J]. *动物学报*, 2002, **48** (4): 487 - 493.
- [15] Jeanmougin F, Thompson J D, Guay M, Higgins D G, Gibson T J. Multiple sequence alignment with Clustal X [J]. *Trends in Biochemical Science*, 1998, **23**: 403 - 405.
- [16] Kumar S, Tamura K, Jakobsen I, Nei M. MEGA: molecular evolutionary genetics analysis Software, Ver 2.0 [J]. *Bioinformatics*, 2001, **17** (12): 1 244 - 1 245.
- [17] Felsenstein J. PHYLIP (Phylogenetic Inference Package), University of Washington, Seattle. 1995. Version 3.5c.
- [18] Slade R. Limited MHC polymorphism in the southern elephant seal: implications for MHC evolution and marine mammal population biology [J]. *Proceeding of Royal Society of London, B*, 1992, **249**: 163 - 171.
- [19] Hoelzel A R, Stephens J C, O'Brien S J. Molecular genetic diversity and evolution at the MHC DQB locus in four species of pinnipeds [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 1999, **16**: 611 - 618.
- [20] Hoelzel A R, Hancock J M, Dover G A. Evolution of the cetacean mitochondrial D-loop region [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 1991, **8**: 475 - 493.
- [21] Baker C S, Perry A, Bannister J L, Weinrich M T, Abernethy R B, Calambokidis J, Lien J, Lambertsen R H, Urbán Ramírez J, Vasquez O, Clapham P J, Alling A O, Brien S J, Palumbi S R. 1993. Abundant mitochondrial DNA variation and world wide population structure in humpback whales [J]. *Proceeding of National Academy of Science of USA*, 1993, **90**: 8 239 - 8 243.
- [22] Yang G, Zhou K Y, Ren W H, Ji G Q, Liu S, Bastida R, Rivero L. Molecular systematics of river dolphins inferred from complete mitochondrial cytochrome *b* gene sequences [J]. *Marine Mammal Science*, 2002, **18**: 20 - 29.
- [23] Hamilton H, Caballero S, Collins A, Brownell Jr R. Evolution of river dolphins [J]. *Proceeding of Royal Society of London, B*, 2001, **268**: 549 - 558.
- [24] Cassens I, Vicario S, Waddell V, Balchowsky H, Van Belle D, Wang D, Chen F, Lal Mohan R S, Simoes - Lopesi P, Bastida R, Meyer A, Stanhope M, Milinkovitch M. Independent adaptation to riverine habitats allowed survival of ancient cetacean lineages [J]. *Proceeding of National Academy of Science of USA*, 2000, **97** (21): 11 343 - 11 347.
- [25] Nikaido M, Matsuno F, Hamilton H, Brownell R L, Cao Y, Ding W, Xuoyan Z, Shedlock A M, Fordyce R E, Hasegawa M, Okada N. Retroposon analysis of major cetacean lineages: The monophyly of toothed whales and the paraphyly of river dolphins [J]. *Proceeding of National Academy of Science of USA*, 2001, **98**: 7 384 - 7 389.