

第一部分 居群生物学、亲缘关系与 DNA 指纹

Bernd Schierwater Rob DeSalle

分子生物学已经成为研究作用于自然居群各种动态与进化因素的必不可少的技术手段。过去，生物学家只能单凭形态与行为突变来研究居群中的遗传变异；现在，数量很少的、与基因型关系不甚明确的表型变异系统已被几乎无限的但与基因型关系同样不明确的分子变异系统所替代；将来，我们则可能用直接对性状与适应起作用的表型多样性的基因的特征变异来进行研究。

本书的第一部分着重于居群水平研究的现状，例证了近年来发展的分子技术在遗传变异、遗传距离、基因流动、居群大小、亲缘关系、适合度和其他有关领域中筛选个体与居群的研究中所表现出来的魅力。仅仅在几年前，这些都还是无法解决的难题，现在却由于分子技术的发展而得以解决 [参见 Powell (1994) 所作的历史性的综述]。我们选择这些章节的目的在于：① 例证一些目前常涉及的问题以及将来可以研究的问题的本质与特性，阐明解决这些问题的潜在技术手段。讨论的重点集中在个体与居群水平，而针对于其他层次的研究只简单论及。

大约在 30 年前，一种新颖而又简单的方法，等位酶蛋白质淀粉胶电泳出现了 (Lewontin and Hubby, 1966; Harris, 1966)，这在居群生物学研究中掀起了一场革命。由于该方法可以容易地得到符合孟德尔遗传规律的数据，在 20 多年的时间里，筛选等位酶成为分析自然居群遗传变异的主要方法。凭借其费用低廉，安全而又易于操作，等位酶电泳仍将是某些领域研究的首选方法 (Hartl et al., 1994; Powell, 1994)。然而在现在及将来的研究中，直接研究 DNA 分子变异的技术将占主导。在 DNA 水平，两个个体之间或任何两个可以操作的分类单元间的变异都是无限制的。由于遗传技术手段的不断进步，这些变异将会越来越易于检测。

从 20 世纪 80 年代早中期检测限制性片段长度多态性 (RFLP) 和发明 DNA “指纹” 技术以来 (Wyman and White, 1980; Jeffreys et al., 1985)，筛选基因组的 DNA 分析技术就朝着容易、精确和分析力度不断加强的方向不断取得进步，同时 DNA 技术的种类也在增加。传统的基于 Southern 斑点杂交的 DNA 指纹技术似乎也失去了当年的风采，已开始广泛地让位于基于 PCR 的技术，这些技术能从高到极高的水平扩增 DNA 位点。然而，RFLP 技术在某些领域保持着一种不可取代的地位，特别是筛选居群中单亲遗传标记以及保护遗传学研究 (如 Schroth et al., 1996)。PCR 型的技术仅要求纳克级的 DNA 量，实验室劳动强度也不高，特别适用于大规模的分析。自从本书的前一版本出版以来，微卫星 DNA 序列的应用和 PCR 任意扩增 DNA 技术 (AAD) 的新发展，包括其在实验工作中的应用正在显著地增加，而且还相应地使等位酶技术以及传统的以 Southern 杂交为基础的技术的应用逐渐在减少。这个趋势在本书所选择的章节中可以得到反映。

PCR 型技术既可以用于扩增多位点 DNA，也可用于扩增单位点 DNA。目前任意扩增 DNA 技术已成为多位点和微卫星类技术领域以及单位点 DNA 类技术领域的主流技

术。任意扩增 DNA 技术使用任意引物扩增大量 DNA 片段，这些技术并不要求预知任何序列信息，可直接应用到任何所感兴趣的基因组的研究中。而且这些技术快速、经济有效，仅要求基本的分子生物学实验操作能力。然而这些技术无一能直接产生等位基因信息，数据的解释也不那么直接。相比之下，单位点微卫星类技术能产生容易解释的等位基因标记，但难以应用到遗传背景不详的基因组中。这些技术要求预先分离特异的多态位点，这是一项耗时费力的工作，而且还要求非常熟练的分子生物学实验操作能力。近年来发展的 AAD 技术与微卫星技术的结合产生了非常丰富的结果，不仅有利于多态的微卫星的分离，而且使这种分离凭借任何遗传背景不详的基因组中纳克级的 DNA 就能实现，这就是所谓的 RAMS 技术（随机扩增微卫星序列）。RAMS 技术用 AAD 的指纹谱，而不是用基因组文库来作为分离微卫星序列的 DNA 源（参见 Ender et al., 1996 及本书 Siva-Jothy and Hadrys 一章）。

选择一个研究手段来回答一个特定的问题，研究人员需要找到一个可行的、能够回答该问题的方法（或几个方法的联合）。某种方法能解决这个问题，而别的方法也能解决这一问题。从而，花费是否经济有效、实验经验、实验室设备以及“个人喜好”将成为选择一个理想方法的其他标准。例如，如果所要解决的问题是确定父本，一个研究者可能决定运用微卫星分析方法，因为他手边已有研究对象的引物，而且他还认为 AAD 方法多位点指纹分析并不适用于他的研究，因为居群中潜在父亲的数量太多；而另外一个研究者则可能运用多位点 AAD 技术，如 RAPD, AP-PCR, DAF 或 AFLP 指纹（参见 Hadrys et al., 1992, 1993 和本书 Caetano-Anollés），因为这些技术容易操作，成功率高，也因为他本人就有过这方面的实践经验，他可能认为居群中潜在父亲的数目并不是一个重要的限制因素，因为他所选择的技术能很容易地产生足够多的 AAD 标记来分辨父本；然而第三个研究者可能决定采用 Southern 杂交型的多位点 DNA 指纹，因为 DNA 的量在他的实验中不成问题，而且实验室的有关设备都很齐全；第四个研究者可能联合运用两种或更多种的方法，比如用 RAPD 指纹统计分析较大的子代集团的父本确定，同时分离多态的微卫星位点运用到其中的二级问题（如本书 Siva-Jothy and Hadrys）。这就是科学的精髓，研究者所面临的问题不同，其所选择的技术手段就不同。

鸟类研究在证明遗传亲缘度作为行为生态、进化与保护生物学中关键因素的重要性方面一直扮演着一个重要的角色。例如，亲缘关系的确定是研究定量分析外配对受精（extra-pair fertilization）和种内同巢寄生（intraspecific brood parasitism）的中心，而这两个现象可能是鸟类交配系统、行为与形态进化的重要选择力量。本书 Webster 和 Westneat 所著章节大致叙述了鸟类作为行为生态研究的模式系统的重要性，并综述了鸟类居群遗传学研究中几个有意思的问题，包括能够应用来研究这些问题的各种分子方法的潜力与局限性。

一些对于研究性别选择机制、交配系统的进化和社会性的进化最有意义的模式系统在昆虫中得以发现。这里面行为的复杂性以及形态适应性都达到了顶峰，给用遗传方法来阐明进化的选择力量带来巨大的挑战。由于许多系统中存在高度的多配性、精子竞争机制、复杂的繁殖形态、巨大的后代集团、社会性、性别内与性别间的竞争，适合度统计变得异常困难（Thornhill and Alcock, 1983）。行为生态学家已经在讨论隐性雌性选择的存在，也就是说雌性在接受与贮存来自于不同交配伴侣的精子后，可能对这些精子进

行选择而只利用某一雄性的精子。在 Siva-Jothy 和 Hadrys 所著一章中，详细讨论了这一最前沿也最具挑战性的问题，同时也指出了研究隐性雌性选择适用的分子方法。Scott 和 Williams 所著一章则提供了能应用于研究昆虫中的关键指数即“适合度”的分子方法的一般讨论。

本节前三篇文章的焦点集中在用适当的分子方法研究某种模型系统，而后两章则着重讨论分子方法本身，以及目前常用方法的应用前景与应用。近来已经开发出几种新的 AAD 技术或对原来老的方法加以改进（请注意：这里所说的老，其实还不到 8 年时间），并已开始运用到居群生物学、保护遗传学、行为与应用生态学领域的研究中。Schlötterer 和 Pemberton 在其所著一章中举例说明了以 PCR 为基础的微卫星分析在自然居群遗传分析中的作用，并综述了该方法在行为生态学和居群遗传学等不同领域的应用研究，Rosenbaum 和 Dienard 则讨论了进化研究中应用微卫星分析的几个理论问题。通过详细分析已知的突变过程和微卫星进化模式，进而讨论应用微卫星分析的优劣之处。Caetano-Anollés 所写一章综述了各种以 PCR 为基础的 AAD 技术的应用前景。因为这些技术不到四年的发展历史，该章不但从居群与个体分析领域，还从一般意义上基因组的筛选等不同领域阐述了其发展前景。

本书的前五章有一个非常有趣而且十分诱人的共同之处，就是破译影响居群结构的选择力度取决于亲缘关系的确定。虽然方法细节在各章中有所重叠，但是各个作者对运用不同技术手段来产生和分析遗传数据持有不同态度。将来我们也许可以期盼更深入地了解各种有机体 DNA 的保守与变异区域的结构，这样更有利于提高进化数据的产生与分析（包括对 PCR 的理论研究；参见 Schierwater et al., 1996）。很清楚，运用微卫星分析和 AAD 技术来分析居群与个体尚未达到顶峰。我们可以预见从不同有机体中分离微卫星位点的研究将迅速增加；新的技术，特别是与 AAD 有关的技术也将进一步增加。我们迟早会开始用 RNA 筛选来研究自然居群中基因表达的差异，AAD 技术可能为 RNA 分析提供一种方法（参见本书 Caetano-Anollés 所著一章），作为直接特异研究控制表型变异和适应的基因变异的第一步。

（何田华译 何田华校）

参考文献

- Ender, A., Streit, B., Städler, T., Schwenk, K. and Schierwater, B. (1996) RAPD identification of microsatellites in *Daphnia*. *Molec. Ecol.* 5: 437–441.
- Ferraris, J. D. and Palumbi, S. R. (eds) (1996) *Molecular Zoology: Advances, Strategies and Protocols*, Wiley-Liss, New York, pp. 65–194.
- Hadrys, H., Balick, M. and Schierwater, B. (1992) Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Molec. Ecol.* 1: 55–63.
- Hadrys, H., Schierwater, B., DeSalle, R., Dellaporta, S. and Buss, L. W. (1993) Determination of paternities in dragonflies by Random Amplified Polymorphic DNA fingerprinting. *Molec. Ecol.* 2: 79–87.
- Harris, H. (1966) Enzyme polymorphism in man. *Proc. R. Soc. Lond. B* 164: 298–310.
- Hartl, G. B., Willing, R. and Nadlinger, K. (1994) Allozymes in mammalian population genetics and systematics: indicative function of a marker system reconsidered. In: Schierwater, B., Streit, B., Wagner, G. P. and DeSalle, R. (eds) *Molecular Ecology and*

- Evolution: Approaches and Applications*, Birkhäuser, Basel, pp. 299–231.
- Hoelzel, A. R. (ed.) (1992) *Molecular Genetic Analysis of Populations. A Practical Approach*, Oxford University Press, Oxford.
- Jeffreys, A. J., Wilson, V. and Thein, S. L. (1985) Hypervariable “minisatellite” regions in human DNA. *Nature* 314: 67–72.
- Lewontin, R. C. and Hubby, J. L. (1966) A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. II. Amount of variation and degree of heterozygosity in natural populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics* 54: 595–609.
- Powell J. R. (1994) Molecular techniques in population genetics: A brief history. In: Schierwater, B., Streit, B., Wagner, G. P. and DeSalle, R. (eds) *Molecular Ecology and Evolution: Approaches and Applications*, Birkhäuser, Basel, pp. 131–156.
- Schierwater, B. (1995) Arbitrarily amplified DNA in systematics and phylogenetics. *Electrophoresis* 16: 1643–1647.
- Schierwater, B., Streit, B., Wagner, G. P. and DeSalle, R. (eds) (1994) *Molecular Ecology and Evolution: Approaches and Applications*, Birkhäuser, Basel.
- Schierwater, B., Metzler, D., Krüger, K. and Streit, B. (1996) The effects of nested primer binding sites on the reproducibility of PCR: mathematical modeling and computer simulation studies. *J. Comp. Biol.* 2: 235–251.
- Schroth, W., Streit, B. and Schierwater, B. (1996) Evolutionary handicap for sea turtles. *Nature* 384: 521–522.
- Thornhill, R. and Alcock, J. (1983) *The Evolution of Insect Mating Systems*, Harvard University Press, Cambridge.
- Wyman, A. R. and White, R. (1980) A highly polymorphic locus in human DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 6754–6758.

分子标记在鸟类亲缘关系研究中的应用：技术与问题

Michael S. Webster · David F. Westneat

摘要

长久以来，亲缘关系就是鸟类行为、生态与进化研究的中心问题。近年来日益发展的分子技术为这些问题的回答呈现出了一个全新的视角。我们在此对这些问题做了一个全面的阐述，并阐明了各种分子技术在鸟类研究中的优缺点。目前研究所关注的焦点是亲代-子代的关系问题。外配对受精（extra-pair fertilizations, EPF）和种内同巢寄生（intraspecific brood parasitism, IBP）作为鸟类交配系统进化中两个最重要的方面，目前除了估计这些事件发生的频率之外，我们对此还知之甚少。多位点标记技术在鉴定来源于外配对受精与种内同巢寄生子代的研究中作用非常突出，因而得到广泛的应用。但应用多位点标记技术在追溯和确定这些子代的亲本时却有许多局限之处。单位点标记能摒弃这些局限，因而在必须追溯真实亲本的研究中最为适用。对于野外生物学家来说，一项技术的实验体系建立时间和实验流程与分析时间是决定研究范围最关键的两个因素，但目前还没有一种技术既能迅速地建立实验体系，又具有简单快捷的分析处理能力。目前的一些研究表明微卫星位点的聚合酶链反应分析可能是实验体系建立时间和实验流程与分析速度之间的一种折衷技术。许多研究结合单位点标记与多位点标记能有效地确定真实亲本。多位点与单位点标记能估计一个鸟类居群的亚居群之间的平均亲缘度，然而很少有研究涉及亲本-子代亲缘关系之外的亲缘度。虽然目前尚未有一项技术能非常精确地确定双胞胎个体之间的亲缘度，但也有一些技术能对此作一个一般性的估计。最终，近来分子标记技术的发展也为鸟类性别比率的研究展现出了一个广阔的前景。本文还提出了鸟类亲缘关系研究中的一些悬而未决的问题。最令人激动而又最为成功的研究是将快速的分子工具应用到自由生活个体广泛的行为与实验中的研究。

前言

亲缘关系（kinship）指从一个共同祖先来的两个或更多个体的后代。这个概念一直处于现代进化与生态理论的中心位置。确实，对合作行为、交配行为、亲本抚育、交配选择、个体散布与性别选择的充分理解全都取决于对亲缘关系知识了解的多寡。更进一步说，亲缘关系是描述居群结构模式的基础，在濒危物种的繁育与重引计划中也必须考虑到亲缘关系（如 Schroth et al., 1996）。因此可以毫无疑问地认为确定居群遗传亲缘度是行为生物学、进化生物学与保护生物学领域的研究者所面临的首要任务。

鸟类研究在这些领域的发展中扮演了一个非常重要的角色（Konishi et al., 1989）。鸟类的亲缘关系研究一度是这些研究的重要领域。然而直到不久以前，鸟类亲缘关系还

主要根据对繁殖行为的观察确定。当观察到一个成年雄性与另一个成年雌性有某种联系，我们就假设它们会相互交配，而产生的幼小个体都被认为是它们的子代。现代遗传学研究清楚地表明，在一些鸟类种中，所观察到的幼小个体常常不是雄性或雌性巢的后代 (Weastneat et al. 1990; Birkhead and Møller, 1992; Westneat and Webster, 1994)。这说明从社会关系来推导遗传亲缘度 (亲缘关系) 并不可靠。

近来分子生物学技术的发展为亲缘关系研究提供了一系列的研究工具。这些工具为回答以前不可能回答的问题扫清了道路，但又牵扯出一系列的新问题，甚至还引发了一些新的困难，限制了所研究问题的类型。这一发展的结果是最近几年来应用分子技术来探讨鸟类亲缘关系的研究近乎爆炸式的增加 (图 1)。

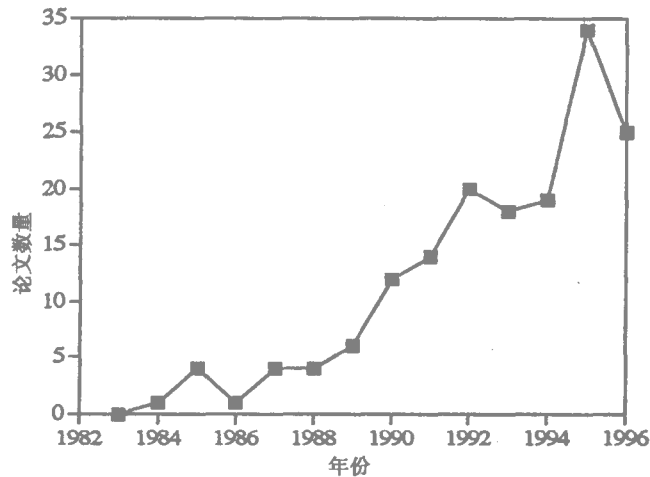


图 1. 应用分子遗传标记技术研究鸟类亲缘关系的研究项目数量 (已发表的研究) 与年份之间的关系。数据通过查阅生物学文摘得到。

本章对应用分子标记技术在鸟类亲缘关系中的研究进展做了一个详细的阐述。我们不想详细地介绍这些技术，因为这些技术本身在另处已有说明，我们也不想赘述所有的应用分子标记技术的研究，而是将重点集中在将面临的问题与可用的技术相配合，并阐明如何来回答这些问题。我们将这些问题的讨论限制在同一个居群个体间的遗传亲缘度问题上，并考虑用分子技术来研究不同居群与种间的亲缘关系 (种系关系)。同样。我们也不想对某一个分子标记技术与统计方法作详尽的叙述，因为许多有关问题在本书的其他章节中或在另处已有介绍。

分子遗传标记技术介绍

分子遗传标记技术可以分为两种主要的类型。一类可以同时测试分析多个位点，另一类一次测试分析一个位点 (表 1)。这其间的差别是选择合适的分子标记来研究所遇到的问题的基础。多位点标记技术能一次分析更多的遗传变异，但不能单独分析某个位

点,这就限制了所得到信息的范围。相比之下 单位点标记易于解释 一个位点对应一个基因型,易于得到等位基因频率),但所筛选到的变异常常较少,难以满足需要,因此需要重复筛选。在一项研究中选用多位点标记,还是用单位点标记,或两者结合使用,取决于几个因素,表 1 例举了其中的一些因素,并进行了一些讨论。

表 1 可用于鸟类亲源关系研究的分子遗传标记技术^a

	多位点小卫星	RAPD	等位酶	单位点小卫星	RFLP	PCR 扩增微卫星
实验体系建立时间 ^b	1 个月	1~2 个星期	2~4 个星期	1~3 个月	1~4 个月	2~6 个月
基因组特异性	从植物到人类	从植物到人类	从植物到人类	属(或科)特异性	未知,可能是种特异性	典型的种特异性,有些引物可能适用于较高一级
实验流程时间 ^c	2~4 星期 ^d	1 星期 ^d	2 天	2~4 星期 ^d	2~4 星期 ^d	2~4 天 ^d
遗传变异性	高	中等	低	3~20 个等位基因	2~4 个等位基因	3~15 个等位基因
无结果的风险	低-中等(因为可供筛选的条带太少)	高(因为显性等位基因,以及 PCR 条件较为敏感)	低(可能有一些哑等位基因)	低	低	低
条带筛选的容易程度	中等-困难	困难	容易-中等	容易	容易	容易-中等

^a 主要根据对蛋白质电泳、多位点小卫星、RAPD 和 PCR 扩增的微卫星有实践经验的作者的经验,也参考了一些文献。

^b 假设实验室有将该技术成功运用于其他种的研究的经验,如果没有,则所有的 DNA 技术最少还另需 6~12 个月,蛋白质电泳需 2~6 个月来学习与调试适当的操作程序。

^c 主要对 15~20 个样品而言,从取材到准备筛选条带整个过程(其间还包括 1~4 天用于提取 DNA)。

^d 该时间仅指一个探针、引物或位点。如果需要进行另外的探针或位点实验,则需要更多的时间(但并不会成倍增加)。

多位点标记技术

小卫星标记

小卫星 DNA 由一个核心序列串联重复多次组成,核心序列一般长度为 15~30 个碱基对。由于许多有相同核心序列的小卫星区域弥散分布于整个基因组中,具同源序列的探针就能检测到多个位点,并产生复杂的带型模式。在许多居群中,这种带型模式具有个体特异性(Jeffreys et al., 1985a, b; Burke and Bruford, 1987; Westneat, 1990)。通过两个个体共有带型的比较,可以估计遗传相似度,一旦将居群水平的变异考虑在内,就可以进一步估计亲缘关系(Reeve et al., 1990, 1992)。

目前,多位点小卫星分析已成为鸟类亲缘关系研究中最受欢迎的方法(Westneat and Webster, 1994)。该技术之所以受欢迎,主要由于以下

两个原因:① 通过多位点小卫星分析可以检测到的遗传变异性非常高。小卫星基因组探针的特异性较低,也就是说针对某一个种设计的探针常常可以应用于许多其他

远缘种。事实上，几乎所有应用多位点小卫星技术进行鸟类研究都是采用哺乳动物或 M13 噬菌体中设计的探针，甚至任意寡聚核苷酸探针也能产生可以应用的 DNA 谱带 (Epplen et al., 1991)。多位点小卫星分析有三个明显的缺点：① 多位点小卫星分析耗时太多。② 有许多条带在胶上分离的距离非常小，筛选非常困难，结果导致同一块胶上点样相距较远的个体难以比较 (Piper and Rabenold, 1992)，不同胶上个体的比较就更为困难。③ 小卫星分析需要相对大量的高质量 DNA，对于一些小的或难以捕捉的个体来说，这种分析技术显得有点高不可攀。

RAPD

随机扩增多态性 DNA (RAPD) 谱带是由一个短的任意引物经聚合酶链式反应扩增的 DNA 小片段 (见本书 Caetano-Anollés 一章)。RAPD 技术具有无法比拟的快速与简捷 (表 1)。由于所用的引物是任意的，因此并不需要对所研究的生物基因组了解太多。RAPD 分析的第二个优点是像其他应用 PCR 的技术一样，对每一个测试个体的 DNA 量需要甚少，所以能应用于分析小个体样本。但 RAPD 也有三个致命的缺点：① 由于实验室的人为或 PCR 的特异结果，将产生许多假带 (如 Levitan and Grosberg, 1993; Schierwater and Ender, 1993; Grosberg et al., 1996; Schierwater et al., 1996)。② 对条带模式的判读比较困难。所检测到的遗传变异仅为中等程度。然而一种集中分析已知在居群内变化的特征性条带的亲本分析方法则有可能取得成功 (Lewis and Snow, 1992; Levitan and Grosberg, 1993)。虽然 RAPD 曾被用于无脊椎动物的亲缘关系研究 (如 Hadrys et al., 1993; Levitan and Grosberg, 1993; Jones et al., 1994; O'Donnell, 1996; Siva-Jothy and Hadrys, 本书)，但鸟类亲缘关系研究却很少采用 RAPD 标记 (仅有一个值得注意的例外：Haig et al., 1994b; Haig, 1996)。

单位点标记技术

蛋白质电泳

蛋白质电泳技术是在居群结构、亲本与亲缘关系分析中第一个广泛应用的遗传标记技术，因而所涉及到的各种统计分析技术也发展比较完善 (如 Pamilo and Crozier, 1982; Pamilo, 1984; Westneat et al., 1987; Wrege and Emlen, 1987)。蛋白质电泳技术的主要优点在于其快速有效。该技术已成为一种常规技术，能很容易地测试大量的个体。其主要缺点，特别对于鸟类而言，在于其所检测到的遗传变异性相当的低，显著地降低了亲缘关系分析的力度 (Barrowclough and Corbin, 1978; Avise and Aquadro, 1982; Zink, 1982; Westneat et al., 1987)。

单位点小卫星标记 (SLM)

单位点小卫星标记技术的原理与多位点小卫星分析基本相同，其差别仅在于所用的探针只识别一个小卫星位点而不是多个位点 (如：Nakamura et al., 1987; Hanotte et al., 1991a)。所以，每一个个体在一个位点的每一个等位基因仅表现一条带，这样就极大地简化了条带模式，有利于筛选与判读，而且还便于不同胶之间带型模式的比较。单

个小卫星位点变异程度相当高如：Gyllensten et al. , 1990; Hanotte et al, 1991b; Kempenaer et al. , 1992), 所以仅仅几个单位点小卫星探针就能进行亲缘关系分析。然而遗憾的是, 单位点小卫星分析也有两个主要的缺点: ① 处理一组样品与从一个探针得到结果所需的时间与多位点小卫星分析基本一样。② 尽管有一些探针可能应用到亲缘关系很近的种中, 单位点小卫星的探针可能有很强的基因组特异性 (Gyllensten et al. , 1990; Burke et al. , 1991; Hanotte et al. , 1992)。虽然近来对该技术有所改进, 分离一个探针所需的时间仍很长 (可能需要几个月)。

限制性片段长度多态性 (RFLP)

RFLP 有时指包括单位点与多位点小卫星分析的一组技术, 本文特指分析限制酶切位点变异的技术。其基本技术与小卫星分析相同 (Southern 分析), 差别在于在 RFLP 分析中, 从所研究的生物中分离出的一个 DNA 片段, 在此片段中有一个限制酶切位点, 该片段用作探针。所产生的带型模式表明在限制性位点哪些个体是纯合的, 哪些个体是杂合的。RFLP 的优点是容易对大量个体的带型模式进行筛选与解释。其缺点在于: ① RFLP 分析所需时间与小卫星分析相同。必须花相当多的时间来分离探针。

每一个探针所检测到的遗传变异性比本章中提到的所有其他分子技术所检测到的遗传变异性都低。由于这些不利之处, 该技术的应用大大地打了折扣, 仅在已知存在一个限制性位点的情况下较为有用 (如 Quinn et al. , 1987, 1989)。

微卫星分析

微卫星 DNA, 或称简单序列重复 (SSR) DNA, 与小卫星 DNA 相似, 等位基因核心序列重复的次数不同。但微卫星核心序列仅几个碱基对长, 短到恰好可以进行 PCR 扩增。微卫星分析对野外研究者来说是一项大有希望的技术 (见本书 Schlötterer and Pemberton 一章), 因为该技术结合了检测高水平的遗传变异与快速地进行 PCR 扩增 (表 1)。用微卫星标记技术分析亲缘关系也有两个不足之处: 在本章所分析的所有技术中, 准备一个微卫星标记系统的时间最长。② 有时存在哑等位基因 (有些基因不扩增, 错误地将纯合体归为杂合体) (Paetkau and Strobeck, 1995; Pemberton et al. , 1995; Primmer et al. , 1995), 因此对结果的解释需特别慎重。

有几个非鸟类分类群的研究应用了微卫星标记来分析亲缘关系问题 (如 Amos et al. , 1995; Evans, 1993; Morin et al. , 1994; Taylor et al. , 1994; Kellogg et al. , 1995; Altmann et al. , 1996; Dow and Ashley, 1996; Paxton et al. , 1996; Richard et al. , 1996)。尽管微卫星标记有非常的大的潜力, 到目前为止, 应用微卫星标记对鸟类亲缘关系进行研究的报道仍属凤毛麟角, 其原因似乎与鸟类基因组较小有关, 而且鸟类基因组中还缺少“垃圾 DNA” (Tiersch and Wachtel, 1991; Hughes and Hughes, 1995); 鸟类基因组文库中有 SSR 位点的克隆比其他分类群中少几个数量级 (M. S. Webster 和 D. F. Westneat, 未发表资料)。这使得寻找有用的 SSR 位点常常很慢, 而且结果往往令人沮丧。不过也有一些研究者应用标准的克隆技术从鸟类基因组中分离到了多态的微卫星 (Ellegren, 1992; Hanotte et al. , 1994; Primmer et al. , 1995; Neumann and Wetton, 1996; Bensch et al. , 1997; Piertney and Dallas, 1997), 应用这些标记在研究鸟类亲

缘关系时已取得一些令人振奋的结果 (McDonald and Potts, 1994; Ellegren et al., 1995; Gibbs et al., 1996, 1997; Sheldon and Ellegren, 1996)。

虽然目前还很少有研究将微卫星分析应用于鸟类中, 而最近两个技术的发展将有力地促进将来的研究。第一, 已有几个技术能在基因组文库筛选前富集微卫星位点。尽管这些技术在细节上有一些不同, 但都是利用膜杂交 (Armour et al., 1994; Kandpal et al., 1994), 或者用生物素偶联的靶分子来分离包含微卫星的基因组片段 (Karagoyozov et al., 1993; Kijas et al., 1994; Edwards et al., 1996; Hammond et al., 1997)。我们自己的实验表明这些技术能使基因组文库中的微卫星频率增加一个或几个数量级, 分离到的 SSR 相对较长, 并且是多态的 (M. S. Webster, 待发表资料)。目前还有一些其他方法有利于微卫星的分离, 包括从纳克级的 DNA 中快速分离多态的微卫星位点 (Ender et al., 1996)。第二, 虽然普遍认为微卫星具有非常高的种特异性, 至少有一部分 SSR 位点具有保守区域 (如 Schlötterer et al., 1991; Bowcock et al., 1994; Engel et al., 1996), 这表明有一些引物可以较广泛地应用到不同的分类群中。对鸟类微卫星的广泛研究发现, 从一个种中分离出的微卫星有将近一半也存在于同一科的其他分类群中, 并且发现有一个引物在所有研究种中都能有效地扩增一个 SSR 位点。这表明最终似乎可以找到一个能广泛用于不同鸟类的“普遍适用”引物组来扩增多态位点。

特定的问题与合适的技术

实验中采用何种技术取决于所要解决的问题。在此我们概括地例举一些研究者运用分子技术所研究的一些问题, 并简要地总结在每一个问题的研究中分子技术最成功的应用, 以前我们曾写过一章详尽地阐述了鸟类亲缘关系的分子研究 (Westneat and Webster, 1994)。本章我们将叙述的重点放在我们上述综述之后发表的研究上。特别是那些尚未完全解决的问题, 并为解决这些问题选择最有用的方法提供一些建议。我们将问题分为两个层次: 有关亲本分析的研究以及有关亲本-子代遗传关系之外的亲缘度的研究。

亲本问题

鸟类中, 选择交配策略十分常见, 使得实际的后代模式与从社会行为推断的非常不同, 有关亲本的研究问题可以分为三个主要类型。大致根据从一个系统想寻求信息量的多少来划分。

1. 社会关系是否反应交配关系, 其间的错误率大约有多大? (粗略排除分析)

从最广泛的意义上来说, 这个问题已经得到了回答, 这得归因于大量细致的分子研究 (Birkhead and Møller, 1992; Westneat and Webster, 1994)。我们现在已经知道外配对受精 (EPF) 在鸟类交配系统中是一个非常普遍的特征, 而种内同巢寄生 (IBP) 至少在一些种中是非常常见的。这些结果完全改变了鸟类交配系统与性别选择的研究。现在看来, 不考虑到这些繁殖策略的影响而只一味地研究社会系统是非常不明智的。

虽然这个基本问题目前已经得到了回答, 但许多有关这种交配策略的结果以及在分类群中的分布并没有得到完全解决。外配对受精的频率在不同种中变化很大, 有一些研究表明在一些种中没有发现外配对受精现象或是非常罕见 (Hill et al., 1994; Warkentin

et al., 1994; Hasselquist et al., 1995; Haydock et al., 1996) 而另有一些研究却发现有一些种中, 外配对受精的频率非常高 (Brooker et al., 1990; Dixon et al., 1994; Mulder et al., 1994)。是什么生态或历史因素引起了这些变异? 同样, 种内同巢寄生的频率在不同的种中变化也很大, 但总的来说没有外配对受精那么普遍 (Westneat and Webster, 1994) 从表面上看来, 这很令人迷惑不解, 因为对雌性来说, 同巢寄生的利益非常高。什么生态或历史因素促使种内同巢寄生发生? 为什么雌性采取这一策略比外配对受精相比较为稀少?

解决这些问题的一个方法是比较研究 EPF 与 IBP, 估计两者的频率。例如, 对雀形目鸟的种间比较研究亲本关系时发现 EPF 的频率与雌性生殖同步性的程度有关 (Stutchbury and Morton, 1995)。同样, 行为研究也表明 EPF 的频率还与集群的程度有关 (Møller and Birkhead, 1993b)。但巢的分布与 EPF 之间的关系还没有得到充分研究 (Birkhead and Møller, 1992)。对一些群巢鸟类的遗传研究表明巢的聚集将促进 IBP (Wrege and Emlen, 1987; Brown and Brown, 1988; Birkhead et al., 1990)。但 IBP 也出现在一些非集群的种中 (Quinn et al., 1987; Price et al., 1989; McKittrick, 1990; McRae and Burke, 1996)。这些假设要求在适当的种系关系对照下进行细致的比较研究。种间比较研究也可以用于探究 EPF 与 IBP 的结果。例如, EPF 的频率与雄性减少对后代的抚育有关 (Møller and Birkhead, 1993a)。这表明亲本投资的减少是 EPF 的一个进化结果。同样, EPF 的频率与雄性羽衣的颜色有关 (Møller and Birkhead, 1994), 而且还与生殖腺的大小有关 (Møller and Birkhead, 1995)。这些结果支持 EPF 的性选择是决定雄性形态的重要进化力量这一假说。

很明显, 要回答这些繁殖策略进化与生态的比较问题, 我们需要研究更多的物种种类。而且当一个研究者在开始一项新的研究时, 在他花更多时间与精力进行细节性的研究时, 常常希望粗略地估计 EPF 与 IBP 的频率。上面所讨论的所有方法都可以用于估计 EPF 与 IBP 的频率, 但这些估计并不要求对亲本的每一个子代都进行鉴定。因此, 最好的技术是牺牲精确度达到快速而易于分析的结果。例如, 蛋白质电泳就相当成功地应用于许多研究中 (如 Gowaty and Karlin, 1984; Westneat, 1987; Wrege and Emlen, 1987) 虽然蛋白质电泳分析十分快速而且实验体系建立时间短, 但所检测到的变异水平相当低, 导致需要增加样本的数量, 并且难以从 EPF 鉴定出 IBP (如 Westneat et al., 1987; Romagnano et al., 1989) 估计 EPF 与 IBP 的误差都较大 (Westneat et al., 1987) 为了得到可接受的估计, 首先要调查变异的位点来计算检测到 EPF 与 IBP 的概率, 从而估计取样大小。

虽然上面所讨论的所有技术都能估计 EPF 与 IBP, 回答这个问题的首选方法还是多位点小卫星分析。多位点小卫星分析的分辨率水平高, 检测概率超过 0.99 (如 Westneat, 1990, 1993; Decker et al., 1993)。高水平的分辨率使得很容易将 IBP 从 EPF 中区分出来, 而且实验体系的建立时间对于从事 DNA 工作的实验室来说并不成问题, 由于具有可以接受的实验体系建立时间以及这样高的分辨率, 运用多位点探针的研究非常受欢迎就不足为奇了。将来也许可以用 PCR 扩增的微卫星来估计 EPF 和 IBP 的频率, 因为应用这种技术, 相对较少的高变异位点就可以产生大量的信息。然而, 直到研究出一组普遍适用的引物, 目前由于该技术的实验体系建立时间太长, 仅为一般性的估计外配

对交配系统而将此技术应用到单个种的研究也是一种不明智的选择。

2. 何种社会关系不反映实际的交配关系？为什么？结果如何？（精确排除分析）

这一问题较前一问题又前进了一步，要求鉴定出绝大部分或者是全部 EPF 或 IBP 的幼小个体。这是研究有关影响这些行为频率的因素以及对其他繁殖行为的影响的一系列问题的前提。例如，研究影响雄性交配警戒行为有效性的因素（Birkhead and Møller, 1992）和影响亲本抚育的亲本影响（Westneat and Sherman, 1993; Whittingham et al., 1993）就要求预知每一个子代的亲本。

有几个较早的利用蛋白质电泳的研究试图对这些问题作一回答（如 Westneat, 1988; Bollinger and Gavin, 1991; Gowaty and Bridges, 1991）。然而由于用蛋白质分析难以从 IBP 中区分出 EPF，并且仅能检测出部分的 IBP 或 EPF，因此需要非常大的取样数量，而且仅能得到限制性的结果。除了少数几个特例之外（如 Gyllenstein et al., 1990; Dixon et al., 1994），上面所提到的单位点分析方法还未广泛应用到这一层次的研究，主要是因为实验体系建立时间太长而限制了这种技术的应用。设计应用微卫星或单位点小卫星分析来鉴别 EPF 和 IBP 的实验在解决这些问题时分辨率要更高，以下我们将对此进行讨论。

目前看来，多位点微卫星技术是解决这一层次的问题的最佳技术选择（但请见 Wettom and Parkin, 1977）。当来自同一家系的所有个体都能在点样在同一块胶上，并且已经排除的幼小个体的实际模式不需要鉴别时，多位点探针不仅能达到较强的统计力度，而且实验体系的建立时间又相对较短。应用这一技术，研究者能够研究导致 EPF 产生的幼小个体的频率变化的雌性或雄性行为（Dunn et al., 1994; Sheldon and Burke, 1994; Stutchburg et al., 1994; Owens et al., 1995; Webster, 1995; Burley et al., 1996; Gray, 1996; Krokene et al., 1996; Wagner et al., 1996a），以及影响交配模式的社会因素（Westneat, 1993; Mulder et al., 1994; Alatalo et al., 1996; McRae, 1996）和影响父亲身份的雄性特征（Hill et al., 1994; Rätti et al., 1995）。

这些研究得到了许多有意思的相互关联的结果。例如，近来有几个研究发现许多鸟类中的雄鸟似乎并不根据它们巢内 EPF 的数目而调整其父本输出（如 Wagner et al., 1996b; Yezerinac et al., 1996）；而另外一些研究发现雄鸟确实根据父亲身份相应调整其父本输出，但并不优先喂养巢内他自己的后代（如 Dixon et al., 1994; Weatherhead et al., 1994; Westneat, 1995）。非常有趣的是，Freeman-Gallant (1996) 发现如果雄性草原雀能为相互合作繁殖的幼鸟提供更多的抚育，雌鸟的 EPF 频率就较低。这表明雌鸟将父本抚育率作为雄鸟遗传质量的一个衡量标准。另外，对于华丽仙鹤来说，在互为帮手的集群中，EPF 最为普遍（Mulder et al., 1994），生殖雄鸟好像能够容忍帮手，因为反过来这些雄鸟也能较自由地与其他雌鸟进行外配对受精（Green et al., 1995）。

虽然这些相互关联的研究对验证假说极有价值，多位点小卫星分析的作用在这些实验研究中表现得淋漓尽致。例如，Rätti 等（1994）通过用实验诱导鲜艳羽色的雄性班驳捕蝇鸟在灰暗羽色的雄鸟领域边界附近筑巢，结果发现羽衣颜色对雄鸟 EPF 成功率并无多大影响。目前也可以直接通过改变羽衣颜色来检验这一假说，但这样的研究并不多见（如 Smith et al., 1991; Ellegren et al., 1995）。Burley 等（1996）通过实验操作雄鸟对雌鸟的吸引力，发现缺少吸引力的雄鸟比有吸引力的雄鸟更可能有不贞的妻子，而

缺少吸引力的雄鸟经常担当起更多的子代抚育责任，而吸引力强的雄鸟更热衷于 EPF。还有一些实验针对检验雄鸟交配警戒的效率 (Davies et al. 1992; Lifjeld and Robertson, 1992; Westneat, 1994; Maedougall-Shaekleton et al. 1996)。

许多研究表明在验证有关雌鸟为何倾心于 EPF 的各种假说，以及研究影响 EPF 频率的生态因素和其他社会行为对 EPF 的影响等方面，这些实验是必不可少的。另外，目前还鲜有研究用多位点小卫星标记从数量上来研究 IBP 的工作 (如 Birkhead et al. 1990; McRae and Burke, 1996)。很清楚，运用分子技术对目前已知存在 IBP 的物种进行相关分析与实验研究将非常有用。因为其实验体系建立时间较短，精确度也相对较高，在可以预见的将来，多位点小卫星分析技术将是解决此类型问题的主流技术手段，虽然有时其所要求的实验流程时间相对较长以及要求数量相对较多的高质量的 DNA 会限制其所应用的研究范围。如果能研制出一套有广泛分类群适应性的 PCR 扩增的微卫星，检测到 EPF 和 IBP 的概率将增加到 0.95~0.99，多位点微卫星则有可能在这一研究水平取代其他多位点探针。

3. 与谁交配？为什么？结果怎样？（确定分析）

行为生态学中的许多问题，特别是涉及繁殖策略与性别选择，都希望准确得知谁与谁交配。例如，理解性别选择对雄性特征的反应要求检查包括 EPF 成功率在内的雄性适合度成分 (Webster et al. 1995)。检测有关 EPF 对雌性的潜在利益的假说也要求获悉雌性让哪个雄性受精她的卵。另外，研究影响 IBP 的因素也希望揭示哪一个雌性产寄生的卵，在什么样的情况下她们会这样做。为了填补我们这些知识中的空白，就必须从一群潜在的亲本中鉴定出巢中幼体的遗传亲本。

多位点 DNA 指纹技术能被应用于该分辨率水平的研究，但其应用可能受到一些限制。在某些情况下，特别是在一雌多雄的种中 (Burke et al. 1989; Oring et al. 1992; Owens et al. 1995) 和一些相互合作繁殖的种中 (Rabenold et al. 1990)，潜在的交配或多或少限制在社会群体中的少量雄性中。在这些情况下，比较容易将所有潜在的交配种鸟，包括子代与它们的母亲点样在同一块胶上。然而在大多数鸟类中，一个巢内的幼体的遗传亲本可能是一个居群的多数雄鸟中的任一个。这给标准的多位点小卫星分析带来一些问题：① 找到一个真实交配种鸟的概率只有通过测试全部成鸟才能有所增加，这纯粹依靠机会；② 不可能将一个巢内的幼体与其所有潜在的遗传亲本样品跑在同一块胶上。后一个问题是该技术在某一水平研究中的一个严重的障碍，因为多位点小卫星复杂的带型模式使胶之间的比较非常困难。这样就必须将巢中的每一个幼体与其潜在的亲本跑在同一块胶上，这使本来就繁重的工作上增加了新的负担，并使对每一个个体 DNA 需求增加很多。

尽管存在这些局限之处，还是有许多研究仅凭多位点小卫星分析的数据就能确定亲本。其中的大部分研究中，外配对的种鸟都来自临近的区域 (如 Westneat, 1993; Stutchbury et al. 1994; Hasselquist et al. 1996)。内标技术与计算机筛选判断条带大小的技术也被用于鉴别从一个大的潜在交配种鸟库中鉴定出产生 EPF 幼鸟的雄鸟 (Mulder et al. 1994; Weatherhead and Boag, 1995)。但这种方法工作量大，而且可能失去一些分辨率，减少可得的信息量，相应地增加了单凭机会来鉴定交配的可能性。

在这一层次遗传分辨率水平的研究中，单位点 DNA 标记的优势与作用显得十分明

显, 因为单位点标记产生的是基因型, 使得不同胶上的结果可以容易地进行比较。已有一些研究应用单位点标记从一个居群中分辨出一个 EPF 子代的一组潜在的雄鸟, 然后用多位点 DNA 指纹技术从这一组潜在的雄鸟中鉴定出真实的 EPF 雄鸟。例如 Gibbs 等 (1990) 仅用一个单位点探针来筛选整个居群, 将每一个巢内幼体的潜在种鸟从 21 个减少到 3 个或更少。RAPD 标记也可能用于此类筛选, 因为该技术能凭借特征性的等位基因将可能的亲本减少到可以用多位点标记分析的程度 (Lewis and Snow, 1992; Levitan and Grosberg, 1993)。

另一个颇有潜力的方法是单独用单位点标记来确定幼鸟亲本。特别值得一提的是, PCR 扩增的微卫星分析相当快速 (在分离到有价值的位点后), 少量的位点就能提供足够的遗传分辨力, 准确地确定亲本。虽然鸟类的微卫星分析滞后于其他分类群, 还是有一些研究证明了微卫星分析在鸟类研究中的应用价值 (Ellegren, 1992; Primmer et al. 1995, 1996)。例如, 假设一个微卫星位点有 10 个等位基因, 并且频率相等 ($q = 0.10$), 一个指定个体配对一个有一个特征等位基因的排除后代的概率是 $2pq + q^2$ 或 0.19, 在 20 个潜在亲本中至少有一个携带等位基因 q 的概率是 0.99 $[1 - (1 - 0.19)/20]$, 然而, 一个指定个体在四个这样的位点配对的概率是 0.001 (假设没有选型交配), 20 个潜在亲本中至少匹配一个的概率是 0.021。IBP 分析需要更多的位点, 因为两个亲本都需要鉴别。这种方法的关键问题是种水平上微卫星需要较长的筛选时间。因为该分析可能进行的实际速度较快, 筛选特异的微卫星引物所需时间对于有兴趣进行这一水平研究的研究者来说也许是值得的。

在很少的一些成功地鉴定出 EPF 种鸟的研究中, 大多数也研究了导致 EPF 成功的雄鸟特征。一些研究表明雌鸟倾向于优先选择那些有特殊形态或行为特征的雄鸟, 而这些特征似乎能暗示雄鸟的活力 (Kempnaers et al., 1992; Weatherhead and Boag, 1995; Hasselquist et al., 1996)。这些结果支持雌鸟倾向于与能给她们后代贡献良好基因、能增加后代活力与吸引力的雄鸟交配的假说。值得注意的是, 在这其中有两个研究发现, 外配对受精产生的后代比内配对受精产生的后代生存能力高 (Kempnaers et al., 1992; Hasselquist et al., 1996)。这少有的几个鉴定出所有子代的种鸟的研究仅是发现了冰山一隅, 我们可以期待将来应用微卫星分析或联合应用几种分子方法的研究必将产生同样令人振奋的结果。

检测亲缘度

行为生态与进化生物学中的许多问题, 诸如研究合作行为、内繁育与散布, 知悉个体间的亲缘度非常重要。在有些情况下, 这可以通过将亲本分析与行为观察结合起来构建一个谱系来完成 (如 Haig et al., 1993)。然而这样的分析并不总是可能实现的。因此必须选择更为实际的估计亲缘度的方法。虽然目前还鲜有利用遗传技术来研究鸟类亲缘度的报道, 但这一方法在许多社会性昆虫与哺乳动物中广为应用, 并已得到了长足的发展。在此我们阐述一些可用的分子方法与统计分析技术, 并阐明其怎样应用于鸟类研究中。

1. 一群个体的平均亲缘度有多大?

亲缘关系分析也和亲本分析一样, 可以根据所要求的亲缘度信息的水平分为不同的

精确性层次。对于某些问题来说,并没有必要对亲缘度(r)的程度作特殊的估计,对群体内平均亲缘度作质的估计就已足够。例如希望知悉是否选择交配的雌鸟或雄鸟比凭机会交配的鸟在遗传上更为有关(如 Bateson, 1983),是否限制性的散布将导致居群亚分(Seitz, et al., 1994),或是否居群中表现出合作行为的一组个体比随机选择的一组个体在遗传上更为相似(Packer et al., 1991; Pfennig and Reeve, 1993)。而另一些问题则需要对居群内的平均亲缘度作更为精确的估计,需要从数量上进行衡量。例如,研究同胞识别机制与同胞选择的分析常常需要估计平均亲缘度系数(r)。

幸运的是,能对平均亲缘度进行质的估计分析技术也同样能计算居群内的平均亲缘度系数。应该说任何能估计遗传相似性程度的技术,包括蛋白质电泳,都能用于该分辨率水平的研究。然而像小卫星 DNA 这样高变异位点能为比较居群的平均亲缘度提供最有力的方法(Lynch, 1990, 1991; Jones et al., 1991; Haig et al., 1993; Blouin et al., 1996)共有条带相似性的水平能用于对不同居群个体的亲缘度进行质的比较。而且,从等位酶开发出的统计技术也能用于从任何单位点标记得出的数据来计算平均亲缘度(Pamilo and Crozier, 1982; Pamilo, 1984, 1989; Wilkinson and McCracken, 1985; Queller and Goodnight, 1989)。这些分析技术也能扩展到多位点小卫星标记(Reeve et al., 1992)和 RAPD 标记(Lynch and Milligan, 1994)。实验已经证明这些方法能精确地估计平均亲缘度(Reeve et al., 1992; Webster, 1995; Blouin et al., 1996)。

时至今日,利用这些分子同胞关系的信息来检验那些一般假说的研究还相对较少。这些研究又可以分为三个层次,首先,一些研究用遗传信息来检查居群遗传结构,而利用 DNA 标记的研究正在日益增加(如 Avise et al., 1992; Haig et al., 1993, 1994a; Haig, 1996)。例如, Baker 等(1995)发现在鹌鸵限制性的散布导致产生居群亚结构。Tegelström and Sjöberg (1995)用 DNA 指纹表明加拿大鹅欧洲居群的遗传变异程度非常低,明显是重复性的建立者效应的结果。还有一些研究利用高精度的分子标记表明存在同胞关系基础上的非常显著的居群亚结构(Parker et al., 1995; Friessen et al., 1996)。同样的技术也被用来研究几个濒危鸟类种的遗传变异与设计有效的保护措施(Brock and White, 1992; Geyer et al., 1993; Haig et al., 1994a, 1995; Signer et al., 1994)。

第二,分子标记也可用来估计内繁育的结果(May et al., 1993a; Marin et al., 1994; Zhu et al., 1996)以及避免内繁育的潜在机制。例如,有一些研究表明,遗传相似性较高的亲本对与其他交配对相比,繁殖失败的水平要高(Brock and White, 1992; Besch et al., 1994; Kempenaers et al., 1996; McRae, 1996)。这些研究还尚未发现雌性利用外配受精来避免内繁育的有害影响(Brooker et al., 1990),但也有一些研究为这一假说提供了些许证据(Wetton and Parkin, 1991; Rätti et al., 1995)。

第三,同胞关系一直被认为是相互合作行为进化中的中心角色。已有几个有关社会性昆虫(Crozier et al., 1987; Strassmann, 1989; Ross, 1993; Evans, 1995; Heinze, 1995; Paxton et al., 1996)和哺乳动物(Reeve et al., 1990; Packer et al., 1991; Lehman et al., 1992; Morin et al., 1994)的研究运用分子标记来验证这一假说。而利用分子标记来对有相互合作行为的鸟类进行的研究还相对较少。分子研究已经证明几个社会性繁殖鸟类的巢内亲本关系是混合的(Jamieson et al., 1994; Millar et al., 1994;

Quinn et al. 1994; Faaborg et al. 1995; Pöldmaa et al. 1995; McRae, 1996)。另有一些运用分子标记的研究也表明一些社会性繁殖的鸟类种中对外受精很稀少或根本没有 (Haig et al. 1994c; Dickinson et al. 1995; Haydock et al. 1996), 在这些情况下, 帮手往往是亲缘关系很近的同胞。更有意思的是, EPF 在相互合作的鹪鹩中极为常见 (Brooker et al., 1990; Mulder et al., 1994; Webster and Pruett-Jones 未发表的资料), 这就使人对在这种帮手行为的进化中同胞关系的重要性产生极大的怀疑 (Dunn et al., 1995; Brooke and Hartley, 1995)。

2. 个体对之间的实际亲缘度有多大? (精确计算亲缘度)

在某些情况下, 有必要获知一对特定个体之间的亲缘度。由于分子遗传技术能提供这样一种遗传相似性的计算, 通过测定条带共享的程度来计算亲缘度的方法是很诱人的。就像我们上面所讨论的一样, 计算居群内几个个体的平均亲缘度是非常有可能的。但当居群内个体数目减少, 估计 r 的置信度也会随之降低。其原因可参见 Lynch (1988, 1990, 1991), 而且这在鸟类中也得到了实验的证实 (Westneat, 1990; Rabenold et al. 1991; Piper and Rabenold, 1992)。一般来说, 因为分子标记技术仅检查基因组的一部分, 并且由于个体间遗传相似性的程度可能在不同的同胞阶层中变异很大, 遗传相似性的测量结果可能在不同的同胞关系阶层中广泛的重叠, 其结果必然是: 两个个体之间遗传相似性的度量并不与它们之间的特定亲缘度系统相一致。

由于存在这些问题, 利用分子遗传技术来计算个体对之间的亲缘度系统的研究很少就不足为奇。在一个非常有意思的研究中, McDonald 和 Potts (1994) 利用微卫星来计算雄性长尾侏儒鸟相互合作的雄鸟对之间的亲缘度, 虽然误差很大, 但是这些计算已经否定了合作关系进化中同胞选择假说。另两个研究利用共享条带的比例已经能够分辨出第一层亲缘关系 (亲代-子代, 同胞) 和第二层亲缘关系 (表亲) (Jones et al. 1991; Piper and Rabenold, 1992), 但其他大多数有关鸟类的研究还没有达到这个分辨率水平 (Westneat, 1990; Haig et al. 1993)。

将来, 希望达到这一遗传分辨率水平的研究仅在某些特殊的情况下才有可能得以成功。如果个体间亲缘度的估计并不要求非常准确 (就像侏儒鸟中那样), 上面提到的几个技术都可能用得上。如果将遗传分析与长期的行为观察 (有一个假设的谱系存在) 结合起来, 则有可能估计两个个体的亲缘度, 但这一般仅在定居生活的居群中才有可能实现。当不可能从幼体一直追踪到成年期, 确定谱系就更为困难, 在这种情况下计算两个个体之间 r 值就必须根据一些假设条件才得以实现。就目前来说, 要达到这样一种遗传分辨率, 所要求的工作量可能太大, 已使人怀疑是否值得, 而仅估计居群内的平均亲缘度的研究倒更为可行。

性比

亲缘关系对性比仍有潜在的影响, 因为亲缘度和其他生态因素一样对性比有控制作用 (Clutton-Brock, 1986; Gowaty, 1993)。在大多数鸟类中, 确定初始性比 (孵化时的性比) 极为困难, 只有到它们长大离巢很久后才能确定个体的性别。这个问题在表现出非常明显的偏性死亡与散布的迁徙性的雀形目中特别尖锐。值得庆幸的是目前已有分离分子性别标记的方法 (Griffiths and Tiwari, 1993), 并已成功地从鸟类中分离出性别标

记(Quinn et al., 1990; Griffiths et al., 1992; Millar et al., 1992; May et al., 1993b; Griffiths and Tiwari, 1995; Millar et al., 1996)。而且这些标记似乎可以应用到不同的分类群中(Ellegren, 1996; Griffiths et al., 1996)。由于方法上的发展,近来有许多研究者已针对有关鸟类中这个令人激动而又最为基础的问题展开研究(如 Longmire et al., 1991; Olsen and Cockburn, 1991; Griffiths, 1992; Ellegren et al., 1996; Nishiura et al., 1996; Sheldon and Ellegren, 1996; Svensson and Nilsson, 1996; Komdeur et al., 1997)。我们可以预期到这方面相类似的研究将会更蓬勃的发展。

结论与将来的方向

上面的阐述清楚的表明了分子技术给鸟类以及其他分类群的亲缘关系研究所带来的巨大推动力量。我们充分地相信图 1 所表示的曲线在今后一段时间内仍将继续保持非常陡的增长,特别是基于 PCR 技术的广泛应用。在我本书前一版本的一个综述中(Westneat and Webster, 1994),我们阐述了将来鸟类亲缘关系分子研究的四个方面,本文所例举的近来的研究表明在这些领域已经取得了长足的进步,但仍有许多有意思的问题亟待回答。第一,分子标记在研究外配对父本问题中应用最为广泛,可以预计今后仍将如此;本文中例举的研究已经表明雌性控制着外配对父本,她们常为了得到更好的基因而与外配对雄性进行交配。外配对受精是决定雄性形态与行为的一种强大的选择力量。然而,这些研究尚未形成定论,有关外配对受精的功能与结果仍存在非常多的争论(如 Sheldon, 1994; Wagner, 1994; Weatherhead, 1994; Webster et al., 1995),而且所研究的物种还远远不够,不可能从一个或两个例子中得出普遍的结论。我们希望将来有更多的研究结合运用分子遗传标记与实验控制来研究外配对受精的机制、精子竞争、影响外配对受精的生态与社会因素以及外配对受精的选择结果。第二,比起 EPF 来,我们对 IBP 还知之甚少,分子标记能够详尽地描画出雌性这一繁殖策略的付出与收益。这使我们理解为什么 IBP 比 EPF 在一些种中相对少见而在另一些种中又如此普遍非常必要。第三,运用分子标记来研究亲本-子代之外的亲缘关系问题还仅刚刚起步,已经进行的有关鸟类的研究表明居群中存在非常细致的家系结构。毫无疑问,这些研究还仅浮于表面。虽然我们从没有用分子标记的研究中获益匪浅(Emlen, 1991),就像这些分子标记在社会性昆虫的研究中所取得的成就一样,分子标记已经能够无可辩驳地提供了强有力的数量上的检验来验证鸟类中相互合作行为的竞争假说。最后,研究性别决定的分子方法已为研究鸟类性别变异等最基本问题开辟了一片新的天地,就像许多其他可以用分子标记所能解决的问题一样,回答的问题仅在几年前还是不可想像的,每一个新的结果都激发出许多新的问题。

正如本书前一版本的有关综述中所描述的一样,分子方法仅仅是进化生物学家可以运用的几个工具之一,最后要将分子工具整合到细致的观察与精巧的实验中去,这样的研究才能产生最大的收益。希望我们这些讨论能够有助于研究者通过均衡从一个特定技术手段所获得的收益与必须为之付出的努力而达到他们的目的。

(何田华译 谭敦炎校)