

分子标记及其在鸟类分子生态学 研究中的应用

常 弘 柯亚永

(中山大学生命科学学院 广州 510275)

摘要: 分子生态学是一门相当新的分支学科,从前人的研究工作来看,分子标记在这个学科中应用非常广泛。本文描述了 RFLP、RAPD、Minisatellite DNA、Microsatellite DNA 和 AFLP 这 5 个分子标记的优缺点及其在鸟类分子生态学中的应用和研究概况。

关键词: 分子标记;鸟类;分子生态学

中图分类号: Q958 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2002)01-79-07

第一作者介绍 常弘,男,48岁,副教授;研究方向:鸟类生态与分子生物学。

收稿日期:2000-12-05,修回日期:2001-06-10

Molecular Markers and Their Application in Avian Molecular Ecology

CHANG Hong KE Ya-Yong

(School of Life Sciences, Zhongshan University Guangzhou 510275, China)

Abstract: Molecular ecology is a considerably new subject. By learning the previous studies in this field, molecular markers have been used universally. In this paper, we describe the advantage and disadvantage of five familiar molecular markers and their application in general research in avian molecular ecology. The five molecular markers are RFLP, RAPD, minisatellite DNA, microsatellite DNA and AFLP.

Key words: Molecular markers; Avian; Molecular ecology

20世纪80年代分子生物学技术的发展不断渗透到生物学的各个领域,也包括生态学。1992年《Molecular Ecology》创刊,标志着分子生态学已经成为生态学的一个新分支学科。它主要是利用分子生物学的技术,从DNA水平来研究生物的生态和种群,具体而言,它所利用的技术主要是探针、引物和序列等,即3类检测生物种群DNA序列多态性的方法,其应用主要在分子种群生物学、分子环境遗传学、分子适应等。而随着生物科学技术的不断发展和进步,分子生态学所用的分子标记也越来越多。

常见的分子生态学的分子标记有:限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)、随机扩增多态DNA (randomly amplified polymorphic DNA, RAPD)、小卫星DNA(minisatellite DNA)、微卫星DNA(microsatellite DNA)、扩增片段长度多态性(amplification fragment length polymorphism, AFLP)等。

1 鸟类线粒体DNA的RFLP研究概况

RFLP是最早发展的分子标记,至今仍被广泛应用,其基本原理是利用限制性内切酶酶切不同的个体基因组DNA后,与已标记的探针杂交,检测的是DNA在限制性内切酶酶切后形成的特定DNA片段的大小,实际上是显示与探针含同源序列的酶切片段在长度上的差异。RFLP的优点是它呈孟德尔遗传且不受环境的影响;它是一种共显性标记,可区分纯合体和杂合体;非等位的RFLP标记之间不存在上位效应;结果稳定可靠,重复性好。缺点是RFLP对DNA的量要大、检测步骤繁琐、周期长,而且用作探针的DNA克隆的制备、保存和使用也不方便;多态检出率低,只能检测内切酶识别位点上的变异,提供的信息有限;一般要用到放射性同位素,对操作者和环境构成危害。

由于动物线粒体DNA(mtDNA)有分子量小,结构是共价闭合环状双链DNA,呈严格的母系遗传,无组织特异性,进化速度快,是单拷贝核DNA的5~10倍^[2]等特点,很适合进行RFLP的研究。而RFLP是最早被利用的研究遗传多样性的方法,故鸟类在此方面的研究也是最多的。最早报道鸟类mtDNA的RFLP研究的是美国俄亥俄州大学的Glaus^[3],他在1981年的博士论文中首次报道了日本鹌鹑、珍珠鸡、环颈雉和火鸡的mtDNA的RFLP长度多态性,并选用1家鸡的16S rRNA、ND6、Cytb、ATPase6、COI、D-Loop基因的DNA探针对这几种鸡形目鸟类进行了Southern杂交,探讨这几种鸡形目鸟类的亲缘关系。Kessler和Avisé^[4]在1984年对几种水禽,如美洲潜鸭(*Aythya americana*)、帆背潜鸭(*A. valisineria*)、葡萄胸鸭(*Anas americana*)等进行了RFLP的系统学研究,1985年^[5]还与别的脊椎动物进行了比较。Avisé在后来的几年继续进行了动物mtDNA的研究工作,并在动物mtDNA进化理论方面作出了杰出的贡献:提出了mtDNA的多态性模型;近缘种的遗传距离;不同地理种群的多态变化;母系遗传的微进化时间表等^[6-9],为鸟类的mtDNA研究打下了基础。

同一时期,Shields和Wilson对美洲5种雁[黑额黑雁(*Branta canadensis*)、黑雁(*B. bernicla*)、细嘴雁(*Anser rossii*)、雪雁(*A. caerulescens*)、白额雁(*A. albifrons*)] mtDNA进行了物种起源和分化的研究,并根据化石资料提出美洲雁的进化速率为每百万年2%^[10,11]。在种内及种间的系统关系的研究上,Shields和Wilson也分析了黑额黑雁的亚种间的mtDNA差异^[12];而Zink则研究了雀形目鸟类不同地理种群在mtDNA的变化^[13]。接着,Ball^[14]在1992年报道了美国中南部6种鸟类的mtDNA不但在种内表现出多样性,而且遗传关系相近种的mtDNA在地理上常常是连续的,说明mtDNA的

RFLP 分析也是进行动物地理学研究的一种灵敏的方法。

另外,许多研究表明,动物 mtDNA 基因组大小的多态性是广泛存在的,据 Shield 等^[13]统计 40 种鸟类 mtDNA 大小平均为 16.3 ~ 17.3 kb,家鸡 mtDNA 全基因组测序表明其大小为 17.775 kb^[15]。而 Dittmann 认为鸮形目鸟类 mtDNA 大小为 18.2 ~ 19.3 kb^[16],Ball 则认为哀鸽 (*Zenaid macroura*) 的 mtDNA 为 19.3 ~ 20.7 kb^[50],显示出较大的多态性。国内李庆伟等^[17]研究了鸮形目 8 种鸟类的 mtDNA 多态性,并提出除草鸮科两种和灰林鸮的 mtDNA 大小在正常范围内外,红角鸮(17.65 kb)、斑头鸮鹞(18.62 kb)、长耳鸮(19.78 kb)和短耳鸮(23.35 kb)都比一般的大,并提出鸮形目鸟类 mtDNA 的进化速率为每百万年变化 2.0% ~ 2.2%,认为鸮形目两个科间在距今 2 800 ~ 3 000 万年前发生分化,而鸮科各种间的分化时间在距今 2 000 ~ 2 500 万年前,即中新世中期。

国内有关鸟类 mtDNA 的研究,最早是吴鹤龄、林建生在 1988 年关于绿头鸭、绿翅鸭、疣鼻栖鸭等的报道。1991 年张亚平等^[18]根据对白腹锦鸡和红腹锦鸡 mtDNA 的 RFLP 研究显示它们的遗传距离只有 0.012,认为它们或许是两个亚种。1994 年王文等^[19]也对家鸡和原鸡的 mtDNA 多态性进行了比较研究。

总体而言,根据已有资料,世界上现已对 131 种鸟类进行了 mtDNA 的 RFLP 研究。

2 鸟类的随机扩增多态 DNA (RAPD) 研究概况

RAPD 技术是 1990 年由 Williams 和 Welsh 首先提出的^[20, 21],是利用一个随机的寡核苷酸引物,通常是 10 个核苷酸,以生物的基因组 DNA 作模板进行 PCR 扩增反应,经琼脂糖凝胶电泳来检测 DNA 序列的多态性。RAPD 的优点是:无需预知目的基因序列信息,不用 DNA 探针,引物长度短(8 ~ 10 bp);只用单个引物,无需常规的双引物;应用 PCR 技术,比 RFLP 所需的模板 DNA 量少得多,且可检测出 RFLP 标记不能检测到的重复序列区;多数呈孟德尔遗传,多态信息含量高;技术简单,不涉及 Southern 杂交、放射自显影或其它复杂的技术;成本较低,因为随机引物可在公司买到,其价格较低。但 RAPD 也有缺点:RAPD 标记是显性标记,无法区分从一个位点扩增的 DNA 片段是纯合的(双拷贝)还是杂合的(单拷贝);在 F₂ 代分离的个体中无法区分哪些是纯合子,哪些是杂合子,无法进行等位基因分析;易受反应条件的影响,稳定性较差。但有研究者认为

只要条件稳定其结果具有重复性^[22]。

鸟类的 RAPD 分析也不多,Haig 等^[23]1994 年对一种红顶啄木鸟 (*Picoides borealis*) 进行了种群遗传多样性的研究。同期 Fleischer 等^[24]也研究了一种濒危的长嘴秧鸡 (*Rallus longirostris*) 在加利福尼亚的种群遗传结构,而 Nusser 等^[25]后来也发现长嘴秧鸡的遗传多样性很低。

国内张细权等^[26]首先对广东地方鸡种的群体遗传变异进行了研究,发现四个鸡种的群体遗传变异较小,但在惠阳胡须鸡发现品种特异性的 RAPD 图带。在闭锁繁育的乌骨鸡中同样揭示低的遗传多样性^[27]。另外,吕雪梅等^[28]还探讨了 RAPD 与杂种优势的关系,发现品系间的遗传距离与各性状及其杂种优势率之间没有显著的相关关系。在珍稀鸟类保护方面,刘斌等^[29]首先对朱鹮进行了 RAPD 的分析并确定了 8 个朱鹮的亲缘关系,为制定保护计划提供了有力的参考。

目前,只对 6 种鸟类进行了关于遗传多样性和与杂种优势关系的 RAPD 分析。

3 鸟类的小卫星 DNA 指纹研究概况

小卫星 DNA 的重复单位在几十到几百个核苷酸,主要分布于常染色质区的近端粒(Telomere),由于不同个体串联区的长度和重复数可变,因而可利用重复单位的同源序列作为探针来杂交而进行多态性分析和染色体定位^[30]。小卫星 DNA 技术的优点是它呈稳定的孟德尔式遗传;具有高度的个体特异性。缺点是以 Southern 杂交为基础,实验周期长;小卫星 DNA 分布较集中,要自己合成探针或从人类基因组研究中获得 DNA 片段与检测的 DNA 进行杂交;VNTR 指纹多是显性遗传,无法区分纯合子和杂合子。

1987 年 Burke 等^[31]利用人源小卫星 DNA 探针首次对一个家麻雀 (*Passer domestic*) 家系进行了研究,发现家麻雀的小卫星 DNA 指纹分析结果与人的类似,也检测出高度变异区,说明小卫星 DNA 指纹对研究野生鸟类的种群统计学、社会生物学和生态学有重要的意义。1990 年孟安明等^[32]研究了疣鼻天鹅 (*Cygnus olor*)、大天鹅 (*C. cygnus*) 和小天鹅 (*C. columbianus*) 的小卫星 DNA 多态性,得出它们的等位基因频率分别为 0.154、0.154 和 0.109;而在一个疣鼻天鹅的家系研究中说明小卫星 DNA 方法是呈孟德尔遗传,且可以进行个体鉴别,表明此方法可用于种群遗传与进化和行为生态学的研究。

小卫星 DNA 指纹技术的出现,使鸟类行为生物学的研究得到很大发展。Haig 等^[33]用 DNA 指纹法证实红顶啄木鸟 (*Picoides borealis*) 在交配对策上,无论帮手

鸟存在与否都是行为和遗传上的单配生殖。Piper 等^[34]用同样方法证明 47 个家庭中的 58 个幼白眼潜鸟 (*Gavia immer*) 确实是始终伴随着雌鸟的雄鸟的后代。但在配偶外性行为研究中, Zilberman 等^[35]最近在研究一夫一妻制的橙丛花蜜鸟 (*Nectarinia osea*) 的配偶外父权 (extra-pair paternity) 关系时, 在 25 对繁殖鸟和 88 个未离巢雏鸟的小卫星 DNA 指纹分析中发现, 有 48% 的雌鸟有配偶外雏鸟 (extra-pair young), 36% 的巢有至少一个配偶外雏鸟, 23% 的未离巢雏鸟是配偶外雄鸟的后代, 而且每窝三个蛋的平均配偶外雏鸟数目 (0.857) 比两个蛋的 (0.286) 大得多, 还说明在准备营巢对和正在繁殖对中的交配成功率与父权关系无关。特别的是 Gibbes 等^[36]的同类实验却发现一个岛屿上的绿背顶鸡 (*Tribonyx mortierii*) 表面看来是由多雄多雌构成的混合社群, 但实际上绝大多数的后代都是来自每群的一个雄性, 说明这是一种行为上多配, 遗传上单配现象。

在亲缘识别方面, 研究亲鸟对幼鸟饲喂是否与亲缘关系有关的问题上, Westneat 等^[37]通过对配偶鸟产幼鸟 (within-pair offspring) 及配偶外雏鸟饲喂频次来检验雄鸟是否对两类幼鸟区别对待, 结果发现, 幼鸟与成年雄鸟的亲缘关系并不影响雄鸟对幼鸟的饲喂; 另外 McRae 等^[38]同样是以小卫星 DNA 指纹法对黑水鸡 (*Gallinula chloropus*) 的研究也表明, 寄生鸟与寄主鸟的亲缘关系并不影响种内巢寄生现象的发生与否。

国内至今只有关于大山雀两亚种的指纹分析研究^[39]和家禽的研究^[40]。其中前者发现大山雀青藏亚种 (*Parus major tibetanus*) 和华北亚种 (*P. m. artatus*) 的 LZFI-1 探针的基因指纹图都有个体特异性, 且青藏亚种的群体遗传多样性较华北亚种的高。而后者对鸡、鸭和鹌鹑三种家禽进行了研究。

根据收集的资料, 目前世界有 28 种鸟类进行了小卫星 DNA 指纹研究。

4 鸟类微卫星 DNA 的研究概况

微卫星 DNA 又称为简单重复序列 (simple sequence repeats, SSR), 是由 2~5 个核苷酸为重复单位组成的长达几十个核苷酸的重复序列, 如 (GA)_n, (CA)_n, (GAA)_n 等, 广泛分布于真核基因组中^[41], 因重复单位数目不同及重复程度的不完全而呈现高度多态性^[42,43]。微卫星 DNA 技术的优点是: 它可通过 PCR 扩增, 特别有利于珍稀物种的非损伤取样法进行保护遗传学的研究; 微卫星的序列一般较短, 即使是部分降解的 DNA 也可能包含足够用来扩增的微卫星序列, 如已在有 1850 年历史的埃及木乃伊中扩增出微卫星位点^[44], 这一点更优于

RAPD 和有更长目的基因序列的 VNTR, 也意味着在野外收集样品的工作量大大降低; 微卫星引物有一定的通用性, 如在一种鲸的基因库中确认的微卫星引物已经成功的应用于许多其它相关的物种中^[45], 火鸡也用鸡的特异微卫星引物成功进行了扩增^[46]; 微卫星 DNA 技术能提供高度的多态性, 在其单个位点有时可检测到 30~50 个等位基因^[43], 这一点在种群的研究和亲子鉴定中很有用。大熊猫被认为是遗传多样性较贫乏的动物^[47], 但张亚平等^[48]用微卫星 DNA 技术分析了 10 个微卫星位点后, 发现有 9 个位点呈多态性; 微卫星 DNA 技术能提供高质量的信息, 因为微卫星 DNA 使用的是经过设计的特异引物, 进行特异性扩增, 稳定性好, 且使用聚丙烯酰胺凝胶电泳, 可分辨出一个碱基对的差异^[42,49,50]; 微卫星 DNA 标记是共显性标记, 能区分纯合子与杂合子, 这一点比 DAF 和 RAPD 更好。微卫星的缺点是微卫星引物的通用性还不够高, 一个物种的特异微卫星引物在别的物种中应用时要进行筛选, 且多在较近缘的物种间利用, 否则可信度会受影响^[46]; 微卫星引物较贵, 成本较高; 使用聚丙烯酰胺凝胶电泳, 技术要求比 RAPD 高。

微卫星 DNA 虽然早在 20 世纪 70 年代就知道存在于真核基因组中, 但由于其微卫星引物不易获得, 限制了它的广泛应用, 但近年来, 由于越来越多的微卫星序列被克隆和测序, 设计了许多微卫星引物, 特别是在禽畜动物方面, 如截止到 1996 年鸡基因图谱中有 680 个标记 (覆盖 3 100 cM), 猪有 1 160 个标记 (覆盖 2 200 cM), 其中大部分都是微卫星标记^[51]。

鸟类开展微卫星标记研究的工作较早的是 Khatib 与 Soller^[52]和 Crooijmans 等^[53], 前二者 1992 年研究了鸡的 MYHE 位点的单核苷酸重复多态性, 后者则在 1993 年分离了鸡的 34 个重复单位为 (TG) 的多态微卫星标记, 其重复数在 9 至 33 之间; 认为一般情况下重复数越大则等位基因的数目越多, 并发现重复单位为 (TG) 的鸡的微卫星 DNA 的重复数大于 9 时有大约 80% 是呈多态的, 而 (TG)_nX_{1,2}(TG)_m 模式的重复序列中, 当 n 和 m 都小于 8 时则只有小于 40% 是多态的。后来则越来越多的学者对鸡的微卫星 DNA 进行了研究^[2,34,55]。

微卫星 DNA 多态性分析技术同样很适合在鸟类的社会行为学研究上应用。Hoglund 等^[56]通过研究一种繁殖时由雌性先向雄性群 (lek) 接近的黑琴鸡 (*Lyrurus tetrix*) 的行为发现, 是雄性而不是雌性构成这个繁殖群体的遗传结构, 并把雄性的这种家族结群行为解析为强烈的归家本能 (philopatry) 所致。而 Saino 等^[57]研究发现家燕 (*Hirundo rustica*) 的子代性别分配率与父亲的尾

羽华美与否无关,也与子代是否雄性亲鸟的后代无关。Double 等^[58]在研究被认为有最高的配偶外受精率的壮丽细尾鸫 (*Malurus cyaneus*) 的交配对策中,发现别的鸟类发生配偶外性行为的目的,一般是为了防止交配不成功或为了提高后代的遗传多样性,而壮丽细尾鸫发生配偶外性行为越多的雌鸟更可能是由于它难以确定最佳雄鸟所致。Dale 等^[59]在研究一种一妻多夫的鸟类——灰瓣蹼鹨 (*Phalaropus fulicarius*) 的配偶外受精 (extra-pair fertilizations, EPFs) 的比例和时间时发现每六窝就有一个配偶外雄鸟后代,并用微卫星技术得到确认,而且有配偶外性行为的雌鸟产蛋的时间比没有配偶外性行为的雌鸟长得多。

在微卫星引物的通用性研究方面,Levin 等^[60]利用 48 个鸡特异微卫星引物对火鸡 (吐绶鸡 *Meleagris gallopavo*) 的基因组进行了扩增,发现有 92% 的引物在火鸡的基因组上得到扩增,在用火鸡的基因组 DNA 为模板的 18 个鸡特异微卫星引物中,有 5 个有多态性,说明有 33% 的鸡特异微卫星引物可以用于火鸡的基因组 DNA 分析,并同意分化时间在一亿年内的同源 DNA 位点都可以用特异微卫星引物通过 PCR 扩增来检测。而现在已有网站提供了一些火鸡的特异微卫星引物 (<http://agriculture.tusk.edu/caens/genome/genome.html>)。

在研究遗传变异与进化方面,Mundy 等^[61]利用多态微卫星位点研究了呆头伯劳一岛屿亚种 (*Lanius ludovicianus mearnsi*) 与另一现在大量存在的大陆亚种 (*Lanius ludovicianus gambelii*) 的两个种群的遗传变异,发现岛屿亚种与大陆亚种有 60% 的遗传变异,并根据现存的与 1915 年收集的 19 个个体进行比较,发现岛屿亚种的大部分变异在近来种群数量锐减了 90% 之前就已经丧失了,而本世纪发生的 20% 的变异丢失可能是由于遗传漂变所致。Grapputo 等^[62]发现芦鹨 (*Emberiza schoeniclus*) 的长喙亚种与短喙亚种的细胞色素 *b* (cytochrome *b*) 和 ND5 序列无明显差别,显示它们分离时间少于 50 万年,但用四个微卫星 DNA 位点研究发现清晰的遗传差异,当考虑两个种群的地理分布时,两个种群的喙长与遗传距离仍是相关的,说明不同地理种群在形态上的适应进化是反映 DNA 水平的进化的。

国内张细权等^[63]1997 年探讨了利用银染法显示禽微卫星多态性的方法,并在 1998 年发表了利用微卫星多态性和 RAPD 进行鸡的群体遗传变异的研究论文^[26],认为微卫星标记可以较好地反映群体内的遗传变异,而 RAPD 则在反映群体间的区别甚至某一群体的特征时可提供明确而直接的信息。

由此可见,微卫星 DNA 技术在鸟类学研究中主要

应用于禽的基因图谱的构建、进行功能基因及 QTL (quantitative trait loci, 数量性状座位) 定位、标记辅助选择 (MAS, marker assisted selection)、在行为学研究中进行 DNA 指纹分析的血缘鉴定和血缘控制,以及进行种群的遗传变异与进化的研究等。经过查阅大量文献,现只有 11 种鸟类进行了微卫星 DNA 的研究。

5 鸟类的扩增片段长度多态性 (AFLP) 研究概况

AFLP 的基本原理是先将 DNA 用可产生粘性末端的限制性内切酶消化而产生大小不同的酶切片段,再与含有粘性末端的人工接头 (adaptor) 连接作为进一步扩增的模板,然后根据接头的核苷酸序列和内切酶识别位点序列来设计引物,即引物 = 接头 + 酶切位点 + 2~3 个核苷酸,进行特异性的 PCR 扩增,扩增产物在变性聚丙烯酰胺凝胶上电泳,显示扩增片段长度的多态性。

AFLP 既是将 RAPD 的随机性和传统 PCR 的专一性巧妙地结合起来,又是 RFLP 与 PCR 相结合的产物,其优点是所需 DNA 量少;不需 Southern 杂交;多态性很高,每个 AFLP 反应可以检测多达 50~100 个位点^[64];实验结果稳定可靠,重复性强,呈典型的孟德尔遗传。但其缺点是要用同位素检测,引物和内切酶等费用昂贵,要用到测序级的凝胶电泳,对操作人员素质及 DNA 质量要求较高,从而影响了其广泛应用。

到目前为止,只发现一种鸟类——蓝点颏 (*Luscinia svecica*) 进行了 AFLP 研究,Questiau 等^[65]利用三个引物对对 36 个家系的 162 个雏鸟进行研究发现,在全部雏鸟中有 41.9% 是配偶外受精的,63.8% 的窝有至少一个配偶外受精的后代,并认为在研究还没有微卫星引物的物种的交配对策时,AFLP 是一种有用的分子标记。

综上所述,分子生态学在鸟类的行为学上的配偶外性行为、繁殖成功率、交配对策、异亲行为、以及聚群行为等,在种群遗传学上的种群内和种群间的遗传多样性、种内与种间的系统发生与进化以及分类学等,还有物种的基因图谱的构建、目标性状的连锁分析与定位、标记辅助选育等进行了大量的研究。但是,也有大量的种类没有开展研究,新的技术应用还不够广泛,如 AFLP 等。这些都需要继续深入研究。

参 考 文 献

- [1] Bachmann K. Molecular markers in plant. *Ecology New Phytol*, 1994, 126: 403~418.
- [2] Cheng H H, Crittenden L B. Microsatellite markers for genetic mapping in the chicken. *Poultry Science*, 1994, 73: 539~

- 546.
- [3] Glaus K R. Structure Organization and Evolution of Avian Mitochondrial DNA. Ph. D. Dissertation, Ohio State University, Columbus, 1981.
- [4] Kessler L G, Avise J C. Systematic relationships among waterfowl (Anatidae) inferred from restriction endonuclease analysis of mitochondrial DNA. *Syst Zool*, 1984, **33**:370 ~ 380.
- [5] Kessler L G, Avise J C. A comparative description of mitochondrial DNA differentiation in selected avian and other vertebrate genera. *Mol Biol Evol*, 1985, **2**:109 ~ 125.
- [6] Avise J C, Vruenhoeck R C. Mode of inheritance and variation of mitochondrial DNA in hybridogenetic fishes of genus *Poeciliopsis*. *Mol Bio Evol*, 1987, **4**:514 ~ 525.
- [7] Avise J C, Ankney C D, Nelson W S. Mitochondrial gene tree and the evolutionary relationship of mallard and black ducks. *Evolution*, 1990, **44**:1 109 ~ 1 119.
- [8] Avise J C, Ball R M. Mitochondrial DNA and avian microevolution. *Acta XX Cong Inter Orni*, 1991, **1**: 514 ~ 524.
- [9] Avise J C, Welson W S, Sibley C G. DNA sequence support for a close phylogenetic relationship between some storks and new world vultures. *PNAS USA*, 1994, **91**:5 173 ~ 5 177.
- [10] Shield G F, Wilson A C. Calibration for mitochondrial DNA evolution in geese. *J Mol Evol*, 1987, **24**:212 ~ 217.
- [11] Shield G F, Wilson A C. Subspecies of the Canada goose (*Branta canadensis*) have distinct mitochondrial DNAs. *Evolution*, 1987, **41**:662 ~ 666.
- [12] Zink R M. Geography of mitochondrial DNA variation on two sympatric sparrows. *Evolution*, 1991, **45**: 329 ~ 339.
- [13] Ball R M, Avise J C. Mitochondrial DNA phylogeographic differentiation among avian population and the evolutionary significance of subspecies. *The Auk*, 1992, **109**(3): 626 ~ 636.
- [14] Shield G F, Heln-bychowski K M. mitochondrial DNA of birds. In: Johnston R F ed. *Current Ornithology*, New York: Plenum Press, 1988. 237 ~ 295.
- [15] Desjardins P, Morsis K. Sequence and gene organization of the chicken mitochondrial genome. *J Mol Biol*, 1990, **212**:599 ~ 721.
- [16] Dittman D J, Zink R M. Mitochondrial DNA variation among phalaropes and allies. *The Auk*, 1991, **108**: 771 ~ 779.
- [17] 李庆伟, 林津, 文伟等. 鸭形目 8 种鸟类线粒体 DNA 多态性研究. *动物学报*, 1998, **44**(1):94 ~ 101.
- [18] 张亚平, 施立明. 两种锦鸡和环颈雉线粒体 DNA 的比较研究. *动物学研究*, 1991, **12**(4):387 ~ 392.
- [19] 王文, 兰宏, 刘爱华等. 家鸡和原鸡的线粒体 DNA 多态性比较. *动物学研究*, 1994, **15**(4):55 ~ 60.
- [20] Williams J G K, Ubelik K A R, Livak J *et al.* DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid Research*, 1990, **18**:6 531 ~ 6 535.
- [21] Welsh J, Mmclelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, 1990, **18**:7 213 ~ 7 218.
- [22] 陈永久, 张亚平. 随机扩增多态 DNA 影响因素的研究. *动物学研究*, 1997, **18**(2):221 ~ 227.
- [23] Haig S M, Rhymer J M, Heckel D G. Population differentiation in randomly amplified polymorphic DNA of red-cockaded woodpeckers *Picoides borealis*. *Mol Ecol*, 1994, **3**(2): 581 ~ 595.
- [24] Fleischer R C, Fuller G, Ledig D B. Genetic structure of endangered clapper rail (*Rallus longirostris*) populations in southern California. *Conserv Biol*, 1994, **9**(5): 1 234 ~ 1 243.
- [25] Nusser J A, Goto R M, Ledig D B *et al.* RAPD analysis reveals low genetic variability in the endangered light-footed clapper rail. *Mol Ecol*, 1996, **5**(4):463 ~ 472.
- [26] 张细权, 吕雪梅, 杨玉华等. 用微卫星多态性和 RAPD 分析广东地方鸡种的群体遗传变异. *遗传学报*, 1998, **25**(2):112 ~ 119.
- [27] 吴晓林, 肖兵南, 蒋隽等. 闭锁繁育乌骨鸡群体的 RAPD 指纹分析. *生命科学研究*, 1998, **2**(4): 278 ~ 282.
- [28] 吕雪梅, 杨关福, 张细权等. 蛋鸡品系 RAPD 变异及其与杂种优势关系的分析. *遗传*, 1999, **21**(2):24 ~ 28.
- [29] 刘斌, 韩之明, 刘彦等. 朱鹮的随机抗增多态 DNA 分析与种内亲缘关系研究. *应用与环境生物学报*, 1999, **5**(1):45 ~ 49.
- [30] Nakamura Y, Carlson M, Krapcho K *et al.* New approach for isolation of VNTR markers. *Am J Hum Genet*, 1988, **43**: 854 ~ 859.
- [31] Burke T, Bruford M W. DNA fingerprinting in birds. *Nature*, 1987, **327**(14): 149 ~ 152.
- [32] Anning M, Carter R E, Parkin D T. The variability of DNA fingerprints in three species of swan. *Heredity*, 1990, **64**: 73 ~ 80.
- [33] Haig S M, Walters J R, Plissner J H. Genetic evidence for monogamy in the cooperatively breeding red-cockaded woodpecker. *Behav Ecol Sociobiol*, 1994, **34**: 295 ~ 303.
- [34] Piper W H, Evers D C, Meyer M W *et al.* Genetic monogamy in the common loon (*Gavia immer*). *Behav Ecol Sociobiol*, 1997, **41**:25 ~ 39.
- [35] Zilberman R *et al.* Extra-pair paternity in the socially monogamous orange-tufted sunbird (*Nectarinia osea osea*). *Israel Journal of Zoology*, 1999, **45**(3): 407 ~ 421.
- [36] Gibbes H L, Goldizen A W, Bullough C *et al.* Parentage analysis of multi-male social groups of tasmanian native hens

- (*Tribonyx mortierii*): genetic evidence for monogamy and polyandry. *Behav Ecol Sociobiol*, 1994, **35**: 363 ~ 371.
- [37] Westneat D F, Clar A B, Ranbo K C. Within-brood patterns of paternity and behavior in red-winged blackbirds. *Behav Ecol Sociobiol*, 1995, **37**: 349 ~ 356.
- [38] McRae S B, Burke T. Intraspecific brood parasitism in the moorhen: parentage and parasite-host relationship determined by DNA fingerprinting. *Behav Ecol Sociobiol*, 1996, **38**: 115 ~ 129.
- [39] 方盛国. 大山雀两亚种基因指纹图的比较研究. 生物多样性, 1996, 4(4): 207 ~ 210.
- [40] 孟安明, 齐顺章, 宫桂芬. 四个探针产生的家禽 DNA 指纹图谱. 生化与生物物理进展, 1993, 20(2): 139 ~ 142.
- [41] Gyapay G, Morissette J, Vignal A *et al.* The 1993 ~ 1994 Genethon human linkage map. *Nature Genetics*, 1994, **7**: 246 ~ 339.
- [42] Weber J L, May P E. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J Hum Genet*, 1989, **44**: 388 ~ 396.
- [43] Amos B, Schlotterer C, Tautz D. Social Structure of pilot whales revealed by analytical DNA profiling. *Science*, 1993, **260**: 670 ~ 672.
- [44] Hoss M, Kohn M, Paabo S *et al.* Excrement analysis by PCR. *Nature*, 1992, **359**: 199.
- [45] Schlotterer C, Amos W, Tautz D. Isolation of simple sequence loci for use in polymerase chain reaction-based DNA fingerprinting. *Electrophoresis*, 1991, **12**: 113 ~ 118.
- [46] Levin I, Cheng H H, Baxter-Jones C *et al.* Turkey microsatellite DNA loci amplified by chicken-specific primers. *Animal Genetics*, 1995, **26**: 107 ~ 110.
- [47] 宿兵, 施立明, 何光昕等. 大熊猫遗传多样性的蛋白电泳研究. 科学通报, 1994, 39: 742 ~ 745.
- [48] 张亚平, 王文, 宿兵等. 大熊猫微卫星 DNA 的筛选及其应用. 动物学研究, 1995, 16(4): 301 ~ 306.
- [49] Litt M, Luty J. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of dinucleotide repeats within the cardiac muscle actin gene. *Am J Hum Genet*, 1989, **44**: 397 ~ 401.
- [50] Tautz D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research*, 1989, **17**: 6 463 ~ 6 471.
- [51] 李宁. 动物基因组研究计划及其对动物育种的影响. 遗传, 1997, 19(增刊): 7 ~ 10.
- [52] Khatib H, Soller M. Mononucleotide repeat polymorphism at the MYHE locus in chicken. *Animal Genetics*, 1992, **23**: 478.
- [53] Crooijmans R P M A, Kampen van A J A, Poel van der J J *et al.* Highly polymorphic microsatellite markers in poultry. *Animal Genetics*, 1993, **24**: 441 ~ 443.
- [54] Crooijmans R P M A, Kampen van A J A, Poel van der J J *et al.* New microsatellite markers on the linkage map of the chicken genome. *Journal of Heredity*, 1997, **85**: 410 ~ 413.
- [55] Gibbs M, Dawson D A, McCamley C *et al.* Chicken microsatellite markers isolated from libraries enriched for simple tandem repeats. *Animal Genetics*, 1997, **28**: 401 ~ 417.
- [56] Hoglund J *et al.* Microsatellite markers reveal the potential for kin selection on black grouse leks. *Proceedings of the Royal Society Biological Sciences Series B*, 1999, **266**(1 421): 813 ~ 816.
- [57] Saino N *et al.* No evidence for adjustment of sex allocation in relation to paternal ornamentation and paternity in barn swallows. *Molecular Ecology*, 1999, **8**(3): 399 ~ 406.
- [58] Double M *et al.* Pre-dawn infidelity: Females control extra-pair mating in superb fairy-wrens. *Proceedings of the Royal Society Biological Sciences Series B*. 2000, **267**(1 442): 465 ~ 470.
- [59] Dale J *et al.* Frequency and timing of extra-pair fertilisation in the polyandrous red phalarope (*Phalaropus fulicarius*). *Behavioral Ecology & Sociobiology*, 1999, **46**(1): 50 ~ 56.
- [60] Levin I, Cheng H H, Baxter J C *et al.* Turkey microsatellite DNA loci amplified by chicken-specific primers. *Animal Genetics*, 1995, **26**: 107 ~ 110.
- [61] Mundy N I, Winchell C S, Burr T. Microsatellite variation and microevolution in the critically endangered San Clemente Island loggerhead shrike (*Lanius ludovicianus narnsi*). *Proceedings: Biological Sciences*, 1997, **264**(1 383): 869 ~ 875.
- [62] Grapputo T, Pilastro A, Marin G. Genetic variation and bill size dimorphism in a passerine bird, the reed bunting *Emberiza schoeniclus*. *Molecular Ecology*, 1998, **7**(9): 1 173 ~ 1 182.
- [63] 张细权, 刘敬顺, 吴显华. 畜禽微卫星多态性的银染法显色. 华南农业大学学报, 1997, 18(增刊): 112 ~ 115.
- [64] Vos P, Hogers R, Bleeker M *et al.* AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 1995, **23**: 4 407 ~ 4 414.
- [65] Questiau S *et al.* Amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers reveal extra-pair parentage in a bird species: The bluethroat (*Luscinia svecica*). *Molecular Ecology*, 1999, **8**(8): 1 331 ~ 1 339.