

DNA 分子系统学在爬行动物中的应用

龚大洁^① 周开亚^②

(^①西北师范大学生物学系 兰州 730070 ;^②南京师范大学生命科学学院 南京 210097)

摘要 爬行动物因其在脊椎动物中具有承上启下的作用,对其进行系统学研究,了解它们的进化关系显得尤为重要。本文从 DNA 杂交、DNA 指纹、RFLP、RAPD 及测序等五个方面对爬行动物的 DNA 分子系统学研究工作进行了综述,对其中的一些问题进行了讨论。

关键词 :DNA ;分子系统学 ;爬行动物 ;应用

中图分类号 :Q78 **文献标识码** :A **文章编号** :0250-3263(2000)04-46-08

第一作者介绍 龚大洁,男,38岁,博士,副教授,研究方向:动物系统学、生物多样性,E-mail:gongdj@nwnu.edu.cn;

收稿日期 :1999-12-24,**修回日期** :2000-03-20

Application of DNA Molecule Systematics in Reptiles

GONG Da-Jie^① ZHOU Kai-Ya^②

(^①Department of Biology, Northwest Normal University Lanzhou 730070, China;

^②College of Life Science, Nanjing Normal University Nanjing 210097, China)

Key words DNA; Molecule systematics; Reptiles; Application

分子系统学是一门在分子水平上研究生物的分类和进化关系的学科。1953年, Watson和Crick提出的DNA双螺旋模型为分子系统学的研究奠定了基础。80年代以后, 随着核酸研究技术的发展, 特别是PCR (polymerase chain reaction)^[1]、RFLP (restriction fragment length polymorphism)^[2]、RAPD (randomly amplified polymorphic DNA)^[3]、DNA指纹 (DNA fingerprinting)^[4]等技术的出现, 使得直接对DNA大量变异的检测和研究成为可能, 并且, 直接从DNA水平研究分子进化也使分子系统学的研究更加深入。在高等动物中, 因爬行动物是真正陆生脊椎动物的原祖, 在系统演化上有重要地位, 因而备受关注。有关其核酸分子的进化研究已有不少报道, 本文就一些主要工作综述如下。

1 DNA杂交 (DNA hybridization)

在进行DNA进化研究的初期, 研究工作主要是通过DNA杂交方法进行的。因此, DNA杂交也称分子杂交 (molecular hybridization), 它是鉴定两条来源不同的聚核苷酸链碱基序列同源性程度的一种方法, 是通过比较杂交DNA分子间解链温度的差异系数来了解不同物种间的亲缘关系, 并可由差异系数来确定物种分歧的时间^[5]。莫鑫泉等^[6]以此方法研究了扬子鳄 (*Alligator sinensis*) 的起源问题, 其结果表明, 扬子鳄并非与同产于淡水的密西西比鳄 (*A. mississippiensis*) 关系最近, 而与泰国鳄 (*Crocodylus autus*) 有更近的亲缘关系, 与湾鳄 (*C. porosus*) 次之, 与密河鳄的关系最远。认为扬子鳄与泰国鳄在3500万年前有共同的祖先; 与湾鳄在4500万年前有共同的祖先, 而与密河鳄的共同祖先则远在6500万年前, 扬子鳄与泰国鳄同是在亚洲发生的较年轻的鳄类。这与传统的基于形态学、细胞学及遗传学研究所得的结论有很大的出入, 因此, 对这个古老的爬行类做更深入的研究是很有必要的。

虽然较蛋白质研究来说, DNA杂交的研究已深入到核酸的水平, 但它与分子标记, 尤其是与测序相比,

还尚欠直观; 其次, 因影响解链温度的因素较多 (如空间结构、凝胶性质等)^[7], 结果并非很可靠。因此近几年来这方面的工作已较少见, 而改为更简便直观的测序等先进方法。

2 DNA指纹 (DNA fingerprinting)

DNA指纹技术是1985年由英国的Jeffreys等人首先创立的。该技术能产生大量DNA多态标记, 且灵敏度高, 在人类遗传学、进化遗传学和法医学上得到了广泛的应用^[8,9]。Galbraith等^[10]用DNA指纹法研究了北美蛇鳄龟 (*Chelydra serpentina*) 的多父关系, 证明多父现象在蛇鳄龟中普遍存在。他对极北蝰 (*Vipera berus*) 的研究也证实虽可能有阻止现象, 但并不阻碍短期交配后的多父现象。认为多父现象有利于增加种群内的遗传多样性, 对动物的繁衍生存有利。

在确定种群的遗传多样性方面, Gray^[11]用此技术分析了石纹水龟 (*Clemmys marmorata*) 的种群遗传组成。通过对分布于华盛顿、俄勒冈和加利福尼亚的三个种群遗传结构的分析, 支持依据形态差异将石纹水龟分为北方的 *C. m. marmorata* 亚种和南方的 *C. m. pallida* 亚种, 并由结果探讨了保护措施, 作者认为要保护和恢复缓慢减少的北方种群, 首先要着眼保护当地的基因库, 以保护这一在形态上具有独特特征的亚种不致灭绝。这对我们进行保护生物学研究、保护物种的基因库具有指导意义。

Patricia等^[12]通过DNA指纹分析发现栖息环境的片断化对点斑水龟 (*Clemmys tuttatus*) 和锦龟 (*Chrysemys picta*) 的影响不同, 不同大小的湿地环境中点斑水龟种群的遗传多样性并没有显著的区别, 而对锦龟而言, 小的湿地环境中种群的遗传多样性要明显地低于大的湿地环境中种群的遗传多样性。Kang等^[13]用BKM-derived 探针对中美短吻鳄 (*Caiman crocodilus*)、恒河鳄 (*Crocodylus palustris*) 及湾鳄进行了DNA指纹分析, 对其相似性指数进行了估计, 探讨了他们的系统发生关系。

3 随机扩增多态 DNA (randomly amplified polymorphic DNA, RAPD)

RAPD 技术是 Williams 与 Welsh 等人于 1990 年创立的。同 DNA 指纹一样, RAPD 也按孟德尔方式遗传, 因此也被称为 RAPD 指纹。又由于它建立在 PCR 的基础之上, 也被称为 AP-PCR^[14], 它具有与 PCR 同样的优点, 并可产生大量的多态位点, 获得较多的遗传信息, 此外, 因 RAPD 所用引物无种属特异性, 可工厂化生产, 因此同其它方法相比, 其费用较少, 可大大降低分子系统学的研究成本。

Densmore 等^[15]用 RAPD 分析了利比利亚半岛上的花斑变色蜥 (*Saceromalus varius*) 饲养种群和野生种群的遗传多态, 认为虽然在饲养种群中相似性指数较高, 但仍有一定的遗传差异, 根据结果他们提出了拯救这一物种的建议: 用杂交法提高其种的遗传异质性, 维持其遗传多样性, 以使这个种能够复壮并恢复。Thorpe 等^[16]分析了法国 10 个岛屿地区的一种岛蜥 (*Gallotia golloti*) 的种群分化和地理分布, 认为与南部的点斑奔蜥 (*Psammodromus hispanicus*) 和快脚蜥 (*Podareis muralis*) 相比, 这种岛蜥起源较晚, 并由其分布推测了岛屿形成的途径, 结果显示 DNA 研究所提供的证据与地质学提供的岛屿形成年代完全吻合。

资料显示, RAPD 对研究爬行类的种间差异也很有效。王义权等^[17, 18]对 14 种蛇类进行了 RAPD 分析, 其结果显示, 虽种内个体间存在着遗传差异, 但从相似性指数分析来看, 种间差异一般显著大于个体间的差异, 作者在研究种间系统进化时, 可用随机取样的一个个体代表一个种进行分析。而且, 其 RAPD 分析结果与染色体及形态研究结果基本一致, 说明 RAPD 标记是生物遗传特性的客观反映, 可作为鉴别物种的分子遗传标记。

有关我国的蝮属蛇类的分类研究, 历来是争论较多的一个问题。沈曦等^[19]用 RAPD 技术研究了我国五种蝮属蛇类的系统发生关系, 认为在中介蝮中, 不同地区的标本及不同亚种间有一定的遗传距离, 种下分化较大, 而蛇岛蝮与中介蝮各种群间的遗传距离更大, 支持将蛇岛蝮升为种, 短尾蝮的江、浙、皖种群间关系接近而与陕西种群关系较远; 而甘肃与陕西高海拔地区的蝮蛇可能均属高原蝮; 乌苏里蝮不仅是一有效种, 而且它处于中国蝮属蛇类的最基部, 即出现最早。以上结果说明蝮属蛇类是一个高度分化的类群, 仍有必要进一步深入研究。

4 限制性片段长度多态 (restriction fragment length polymorphism, RFLP)

RFLP 是指用识别特定碱基序列的限制性内切酶 (restriction endonucleases) 对 DNA 进行单酶或双酶消化后, 含有同源序列的限制性片段在长度上的差异^[2]。根据这种差异, 可计算不同个体或种群间的片段共享程度, 导出遗传距离, 并根据限制性位点的差异计算出 DNA 的碱基替换率。但由于技术本身的限制, 只有分子较小的拷贝 (或少数拷贝) 的序列才能用作 RFLP 分析^[20, 21]。存在于细胞质的线粒体 DNA (mtDNA) 以其自身的特点 (单拷贝, 分子量小, 结构简单, 进化速率快, 独立性强, 母系遗传, 无组织特异性, 在同类生物中进化速率一致及易于提取) 是目前研究 RFLP 的最好材料。除 mtDNA 外, 可用作 RFLP 分析的还有核糖体 DNA (rDNA) 等。现一般认为, 亲缘关系较近的物种 (分歧时间在百万年至一千万年之间) 适于采用 mtDNA 进行分析。而对于亲缘关系较远的物种 (分歧时间在五百万年至五千万年), mtDNA 分析会产生误差, 宜选用 rDNA 进行分析^[22]。

4.1 单性蜥蜴的起源

自 Wright 在 1978 年^[23]报道了北美的单性鞭尾蜥后, 这个问题引起了许多学者, 尤其是爬行动物学家们的兴趣。分子方面较早进行的工作就是鞭尾蜥的 RFLP。1979 年 Brown 等^[24]首次应用 mtDNA 进行限制内切酶消化, 并结合电镜观察的方法研究了鞭尾蜥属中单性的新墨西哥鞭尾蜥 (*Cnemidophorus neomexicanus*) 和棋斑鞭尾蜥 (*C. tessellatus*), 认为二者分别为虎斑鞭尾蜥 (*C. tigris*) 与素色鞭尾蜥 (*C. minornatus*) 及虎斑鞭尾蜥与 *C. septemvittatus* 的杂交后代, 这个结论与形态、核型及等位酶的分析结果相一致, 研究结果还表明虎斑鞭尾蜥 (尤其是 *C. tigris maroratus*) 是新墨西哥鞭尾蜥、棋斑鞭尾蜥的母系种, 此外, RFLP 数据还显示, 这两个单性种较之虎斑鞭尾蜥的某些族 (races) 要年轻。在此之后, 许多学者也对此进行了研究^[25, 26]。结果均表明: 1) 单性种群是两性种群的杂交后代; 2) 单性种群的遗传分化较两性种群低得多, 一般在单性种群内限制性位点差异很小; 3) 单性种群一般起源于地理上相互接近的两性种群; 4) 一般单性种群都较年轻, 表明它们是最近才形成的。

此外, 在异虎 (*Heteronotia binoei*) 中也发现了单性种群, Moritz^[27, 28]对这种单性的壁虎科动物进行了详细的研究。这个种分布于澳洲中部至西部海岸, 与其它的单性种群相比, 其 mtDNA 显示出较高的多样性。

系统发生分析表明西部单性种群母本可能是来自于西部种群,而东部单性种群来自于东部。虽然西部的单性种群 mtDNA 多样性较高,但低于两性种群内及种群间的差异,说明这些单性种群可能起源于相对小的地理范围,具有两种 mtDNA 型。因此,这两个单性种群应是两个种。

4.2 种间关系与濒危物种的保护

穴居沙龟(*Xerobates agassizi*)是广泛分布于北美的陆生龟类,关于其究竟是单一种还是复合种一直存有争议。Lamb^[29]用 14 种内切酶对沙龟所有分布区的个体进行了 RFLP 分析,认为这是一个复合体。它由 4 个种组成,分为 2 组,并指出东部的穴居沙龟分支可能是 *X. berlandieri* 的祖先,从分子角度肯定了复合体的存在。

分布在中美洲海域的克氏丽龟(*Lepidochelys kempi*)由于繁殖地的减少,现为一濒危种,仅在墨西哥西部海域繁殖。而欧氏丽龟(*L. olivacea*)数量较多,在整个暖热带繁殖,二者形态相似,故有人认为它们为同一种,如真是那样,似无濒危之虞。但 Bowen 等^[30]所作的 mtDNA 的 RFLP 分析表明,这两个种在母系发生上不同,二者为姊妹种,在巴拿马海峡形成时就可能已经发生分离,故应分别保护这两个种的种质资源。

绿海龟(*Chelonia mydas*)也为一种濒危动物,其种群基因交流的状况对物种的保存有很重要的意义。Avisé 等^[31]克隆了其 7 个未知的核基因,然后对全球 15 个繁殖群体的 256 只个体进行这些基因片段的 RFLP 分析,结果表明,虽然以前的 mtDNA 研究认为该物种的这些种群高度分化,但核 DNA 分析却表明种群间存在着一定的基因交流,并且遗传相似性与地理远近呈正相关。这个结果使研究者看到了复壮这个种的希望,也提示应注意核 DNA 与 mtDNA 结构上的差异。

广布于北美的蛇鳄龟(*Chelydra serpentina*)亚种间的分化,以前基于形态学和骨骼学一直未得出一致的结论。Phillips 等^[32]用 mtDNA 的 RFLP 方法分析了其四个亚种的关系,指出北美洲两个亚种关系最近,差异系数为 0.5%,中美洲两个亚种之间(1.7%)及它们与北美洲亚种之间(4.45%)差异较大。根据 RFLP 数据,作者认为中美的 *C. s. rossignonii* 和 *C. s. acutirostris* 间及二者与北美两亚种间的差异均已达到种级水平。上述工作对濒危物种的保护有重要的指导意义,可推动对鲜为人知的种质资源的保护。

锦蛇属是蛇类的一个大属,其遗传分化亦为研究者所关注。Pail^[33]对白条锦蛇(*Elaphe diene*)、棕黑

锦蛇(*E. schrenckii*)、红点锦蛇(*E. rufodorsata*)及 *E. quadrivirgata* 的 mtDNA 的 RFLP 分析后,发现白条锦蛇 mtDNA 有 18 kb 和 19.5 kb 两种基因组,变异是由 1.5 kb 片段的缺失和非缺失所致。而 *E. quadrivirgata* 的种内差异要较其它种稍高,说明锦蛇属内不同种的遗传分化不同,对其分类尚需进一步研究。这一点也同样为后来的测序工作所证实。

5 DNA 序列分析

对分子系统学来说,DNA 序列方法的结果最为可靠、最直接,对近缘种或远缘种均适合。自 PCR 技术出现后,使得不仅从新鲜组织,而且从陈旧的标本中获得 DNA 也变得比较容易,因而 PCR 产物的直接测序技术得到了广泛应用。对组织样品中所获得的 DNA 进行特定片段的序列测定后,再用特殊的软件包进行分析,就可重建动物的系统发生关系。最近几年,序列分析在爬行类系统学研究中应用较多,主要集中在以下几个方面。

5.1 物种的起源与形成研究

由于序列分析的准确性好和可比性强,可通过大量分析特定序列在种内和种间的变异情况,来了解种群的结构和物种间的分化。Waster 等^[34]认为,许多毒蛇由于生态环境的相似及形态上的趋同性,不易从形态学上描述种内变异或异域的物种形成,而选择中性或近中性的 mtDNA 的序列,可揭示被形态变异较小而掩盖了的进化关系。他们通过细胞色素氧化酶亚单位 I(Co I)基因的序列分析,认为东南亚一种眼镜蛇(*Naja siamensis*)有别于眼镜蛇(*Naja naja*),是一种广泛分布的眼镜蛇隐种。这一结果不仅有系统学意义,对蛇伤防治亦有重要价值。因为只有正确分类的基础上,搞清不同毒蛇毒液成分后才可对症下药,避免误诊。

核型分析的结果表明,许多蜥蜴类,特别是新大陆蜥蜴,存在种内核型多态。这些异型核型的种群间究竟关系怎样,过去不得而知。Arevalo 等^[35]对墨西哥中部条纹强棱蜥(*Sceloporus grammicus*)的 8 个染色体族(races)mtDNA 的 2 479 bp 的序列进行了分析,发现条纹强棱蜥的不同染色体族间序列差异百分比竟达 23%,而强棱蜥属不同种间的差异百分比最大仅为 26%,指出这些染色体族有些已进化为独立的种,有必要对他们的分类进行更为详细的研究。

从 DNA 的序列分析可以更方便地了解种群的遗传差异。Lahanas 等^[36]通过对线粒体 DNA 控制区序列的分析,研究了大加勒比海域迁徙性的绿海龟的分

子进化和种群遗传学特征。多样性分析显示,东、西加勒比海域繁殖种群分化较大。提示对不同种群分别进行保护,这样才可能全面保护生物的基因不致丧失。

5.2 动物地理学研究

Pate 等^[37]对哥斯达黎加和佛罗里达的 2 个绿海龟种群进行了线粒体 DNA 控制区的分析,以验证怀孕的雌性海龟是回到其出生地产卵的假说。结果显示这两个种群因母系不同而存在遗传结构上的差异,但佛罗里达的绿海龟种群内 mtDNA 多样性较高,前者支持绿海龟在出生地繁殖,后一结果有两种解释:1)佛罗里达种群为混合种群,有多个来源迁入;2)它是一个大的、古老的残存种群。认为在西部大西洋其它种群中,佛罗里达单倍型的存在与否是验证这两种假说的关键之所在。

5.3 种间关系及系统进化研究

5.3.1 蜥蜴类

这方面较早的工作是 Hedges^[38]对黄蜥科(Xantusiidae)7 个种的 12S rRNA 和 *Cyt b* 的序列分析,所得的系统发生分析结果提示:古巴的粒蜥(*Cricosaurus typica*)是其它黄蜥类的姊妹种,中美洲疣蜥属(*Lepidophyma*)与黄蜥属关系最近,而在黄蜥属中,夜黄蜥(*Xantusia riversiana*)与沙生黄蜥(*X. vigilis*)关系最近。而过去的形态学分析则认为粒蜥与疣蜥关系最近,将夜黄蜥作为独立的属(*Klauberina*)处理。据此 Hedges 推论,根据序列变异水平和大陆化石年代特征,粒蜥属的起源与晚白垩纪大安第斯山脉的地壳构造的演化有关。

Caprigione 等^[39]从一种快脚蜥(*P. sicula*)的异染色质区分离了富含腺嘌呤和胸腺嘧啶的高度重复的卫星 DNA,并对其序列进行了分析,认为这种卫星 DNA 仅为蜥蜴科动物所特有,它位于染色体着丝粒的结构异染色质区。Southern 印迹杂交显示快脚蜥属似与北非蜥属(*Algiroides*)及一种蜥蜴(*Lacerta dugesii*)有更近的亲缘关系,首次将序列分析与染色体结构联系起来讨论。

Bruna 等^[40]对太平洋的石龙子科的岛蜥属(*E-moia*)进行了线粒体 DNA 序列分析,指出在岛蜥属中,蓝尾岛蜥(*E. cyanurum*)与岛蜥(*E. impar*)的序列差异百分比为 17%~19%,*E. caeruleocanda* 与蓝尾岛蜥差异为 23%,而 *E. caeruleocanda* 与岛蜥的差异为 22%~23%,因此肯定蓝尾岛蜥与岛蜥为区别明显的不同种,将岛蜥由亚种重新恢复为种级。这一结果提示序列分析可为形态分类提供有力的佐证。

5.3.2 蛇类

在响尾蛇类中,侏响尾蛇属(*Sistrurus*)因头部的大鳞片与响尾蛇属(*Crotalus*)不同而被分为

不同的属。但其与响尾蛇关系如何?是来源于响尾蛇类还是单独起源?过去一直不清楚。此外响尾蛇属又有两个分支:一支头部具部分大鳞,另一支头部全分裂为小鳞片,那么这两支的关系又如何呢?Knight 等^[41]对侏响尾蛇属与响尾蛇属进行了 12S rRNA 和 16S rRNA 的序列比较研究。结果表明,侏响尾蛇属和响尾蛇属均为单独起源,响尾蛇属作为单系,起源于中生代。这与形态学得到的假说相一致。另外,一个世纪以来,高等蛇类主要支系的进化关系及眼镜蛇类、蝰蛇类等有毒蛇类的起源一直是许多学者们研究的焦点,虽得出了许多结论,但均因缺乏有力的证据而存在争议。Knight 等^[42]又比较了高等蛇类三个支系主要代表种的线粒体 12S rRNA 和 16S rRNA 的部分序列,研究结果表明,蟒科的巨蟒(*Boa constrictor*)与游蛇科的游蛇(*Coluber constrictor*)关系较近,他们两者与蝰科的沙蝰(*Vipera ammodytes*)较远,与眼镜蛇科的眼镜蛇关系更远。这个结果与免疫学结果一致,但与传统的、公认的有毒蛇类单一起源、蝰科与眼镜蛇为姊妹群的观点相异,更是抛弃了 McDowell 1986 年提出的眼镜蛇为蛇类基部分支的假说。

Wang 等^[43]用银染测序的方法对 12 种游蛇 mtDNA 的 *Cyt b* 基因进行了序列分析,结果表明,在 12 种游蛇中,赤链蛇与水赤链游蛇为一组,乌梢蛇与灰鼠蛇为第二组,锦蛇属为第三组,锦蛇属与灰鼠蛇的关系较近。而锦蛇属则是一个高度分化的属,它至少可分为两组,一组为百花锦蛇和黑眉锦蛇,另一组则包括玉斑锦蛇、棕黑锦蛇、红点锦蛇、王锦蛇和双斑锦蛇。这一结果与 RFLP 的研究结果很接近。

5.3.3 龟类

龟类是现生爬行动物中最古老的类群之一,对其进行 DNA 序列分析可为认识爬行动物的系统进化关系提供有益的证据,Lamb 等^[44]对图龟属(*Graptemys*)12 个种的 mtDNA 的 RFLP、*Cyt b* 及控制区序列分析表明,这类龟是一个古老的类群,进化很缓慢,用 RFLP 和 *Cyt b* 均无法区分不同的种,只有控制区可区分不同的种。因此认为,在龟类中,mtDNA 控制区的研究在种的鉴别和系统发生分析方面结果最好。另外,在图龟属的不同种中,限制性位点的差异系数为 0~3.2%,*Cyt b* 序列差异百分比为 0~1.5%,仅是其它脊椎动物种间差异的最低值,因此在进行龟类序列分析和系统进化研究中必须考虑这一特点。

Bickham 等^[45]对龟科的 15 种龟类进行的线粒体 16S rRNA 的 556 个碱基的序列分析表明,龟科可分为两个亚科,与前人根据形态学特征把龟科分为鸡龟亚科(Deirochelyinae)和龟亚科(Emydinae)相一致。在鸡

龟亚科内, 鸡龟属 (*Deirochelys*) 以为该亚科其它属的姊妹群, 找出了 *Trachemys*、图龟属和菱斑龟属 (*Malaclemys*) 的分支证据, 但该亚科中其它属的关系尚不能确定。龟亚科内箱龟属 (*Terrapene*) 为单系发生, 但水龟属 (*Clemmys*) 为并系发生, 看来似有必要对水龟属进行重新分属。

5.3.4 鳄类 鳄类也是现代爬行类中古老的一类, 有人认为它可能是中生代恐龙的子遗种类^[46], 因此, 对其进行分子进化的研究可为了解中生代爬行类提供分子证据。有关鳄类的进化历史已有很多研究。在长喙的种类中, 马来鳄 (*Tomistoma schlegelii*) 和食鱼鳄 (*Gavialis gangeticus*) 的系统发生关系存有争议^[47]。在形态学分支分析和进化分析中, 把食鱼鳄归为其它鳄类的姊妹种, 由马来鳄属、鳄属和短吻鳄属组成单系群。而生化蛋白质分析表明马来鳄属与食鱼鳄最相似, 他们与鳄属及短吻鳄关系稍远, 与淡水鳄科关系最远。Gatesy^[48]对马来鳄、食鱼鳄、菱斑鳄 (*Crocodylus rhombifer*) 和中美短吻鳄 (*Caiman crocodilus*) 的线粒体 12S rRNA 基因进行了序列分析, 所建的系统树与上述生化结果一致。

参 考 文 献

- [1] Saiki, P., K. Scharf, S. J. Faloona *et al.* Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequence and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 1985, **230**: 1350~1354.
- [2] Brown, W. N. Polymorphism mitochondrial DNA of human as revealed by restriction endonuclease analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, **77**: 3605~3609.
- [3] Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. A. Rafalski *et al.* DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acid. Res.*, 1990, **18**(2): 521~535.
- [4] Jeffreys, A. J., V. Wilson, S. L. Thein. Individual-specific "fingerprints" of human DNA. *Nature*, 1985, **316**: 76~79.
- [5] Nei, M. ed. *Molecular Population Genetics and Evolution*. Amsterdam and New York: North Holland Publ. Co., 1975.
- [6] 莫鑫泉, 赵铁军, 秦鹏春. 扬子鳄的起源. 中国科学 B 辑, 1991(10): 1047~1053.
- [7] Steven, D. W., M. S. Springer, J. Britten. Nucleic acids I: DNA-DNA hybridization. In: David, M. H. and C. Moritz ed. *Molecular Systematics*. Sunderland, Massachusetts, USA: Sinauer Associates Inc. Publishers, 1990. 169~204.
- [8] Jeffreys, A. J., N. J. Royle, V. Wilson *et al.* Spontaneous mutation rates to new length allele at tandem-repetition hypervariable loci in human DNA. *Nature*, 1988, **332**: 278~281.
- [9] Jeffreys, A. J., K. Tanaki, A. Macleod *et al.* Complex gene conversion-events in germline mutatin at human minisatellites. *Nature Genetics*, 1994, **6**: 136~145.
- [10] Galbraith, D. A., B. N. White, R. J. Brooks *et al.* Multiple paternity in clutches of snapping turtles (*Chelydra serpentina*) detected using DNA fingerprints. *Canadian J. Zool.*, 1993, **71**(2): 318~324.
- [11] Gray, E. M. DNA fingerprints reveals look of genetic-variation I: northern populations of the western pond turtle (*Clemmys marmorata*). *Conservation Biology*, 1995, **9**(5): 1244~1255.
- [12] Patricia, G. P., H. H. Whiteman. Genetic diversity in fragmented populations of *Clemmys guttata* and *Chrysemys pictamarginata* as shown by DNA fingerprinting. *Copeia*, 1993(3): 841~846.
- [13] Lang J. W., R. K. Aggarwal, K. C. Majumdar *et al.* Individualization and estimation of relatedness in crocodylians by DNA fingerprinting with a BKM-derived probe. *Molecular & General Genetics*, 1993, **238**(1~2): 49~58.
- [14] Welsh, J., M. Maclelland. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucl. Acid. Res.*, 1990, **18**(24): 7213~7218.
- [15] Densmore, L. D. III, D. P. Erika, E. L. Howard. A molecular approach determining genetic variation in captive and natural population of the Piebald Chuckwalla (*Sauromalus varius*). In: Murphy, J. B., K. Alder, J. T. Collins ed. *Captive Management and Conservation of Amphibians and Reptiles*. Ithaca (New York): Society for the Study of Amphibians and Reptiles, 1994. 343~351.
- [16] Thorpe, R. S., P. M. Duncan, M. C. Alastair *et al.* DNA evolution and colonization sequence of island lizards in relation to geological history: mtDNA RFLP, Cytochrome *b*, Cytochrome oxidase, 12S rRNA sequence, and nuclear RAPD analysis. *Evolution*, 1994, **48**(2): 230~240.
- [17] 王义权, 周开亚. 游蛇科 10 种随机引物扩增多态 DNA 的研究. 应用与环境生物学报, 1996, **2**(3): 273~279.
- [18] 王义权, 周开亚, 秦树臻. 用 RAPD 检测六种蛇基因组 DNA 多态性. 动物学报, 1996, **41**(2): 172~181.
- [19] 沈曦, 周开亚, 王义权. 中国蝮属蛇类的 RAPD 分析. 动物学报, 1999, **45**(1): 40~48.
- [20] Moritz, C., J. W. Wright, V. Singh *et al.* Mitochon-

- drial DNA analysis and the origin and relative age of parthenogenetic *Cnemidophorus*. V. the *Cozumela* species group. *Herpetologica*, 1992, **48**(4):417~424.
- [21] 徐吉臣, 朱立煌. 遗传图谱中的分子标记. 生物工程进展, 1992, **12**(5):1~5.
- [22] 张亚平, 施立明. 动物线粒体 DNA 多态性的研究概况. 动物学研究, 1992, **13**(3):289~298.
- [23] Wright, J. W. Parthenogenetic Lizards. *Science*, 1978, **201**:1152~1155.
- [24] Brown, W. M., J. W. Wright. Mitochondrial DNA analysis and the origin and relative age of parthenogenetic Lizards (Genus *Cnemidophorus*). *Science*, 1979, **203**:1247~1249.
- [25] Moritz, C., J. W. Wright, V. Singh *et al.* Mitochondrial DNA analysis and the origin and relative age of parthenogenetic *Cnemidophorus*. V. the *Cozumela* species group. *Herpetologica*, 1992, **48**(4):417~424.
- [26] Moritz, C., J. W. Wright, W. M. Brown. Mitochondrial DNA analysis and the origin and relative age of parthenogenetic *Cnemidophorus*: phylogenetic constraints on hybrid origins. *Evolution*, 1992, **46**(1):184~192.
- [27] Moritz, C. The origin and evolution of parthenogenesis in *Heteronotia binoei* (Gekkonidae): evidence for recent and localized origins of widespread clones. *Genetics*, 1991, **129**:211~219.
- [28] Moritz, C., A. Heideman. The origin and evolution of parthenogenesis in *Heteronotia binoei* (Gekkonidae): reciprocal origins and diverse mitochondrial DNA in western populations. *Syst. Biol.*, 1993, **42**(3):293~306.
- [29] Lamb, T., C. Lydeard, R. B. Walker *et al.* Molecular systematics of map turtles (*Graptemys*): a comparison of mitochondrial restriction site versus sequence data. *Syst. Biol.*, 1994, **43**(4):543~559.
- [30] Bowen, B. W., A. B. Meylan, J. C. Avise. Evolutionary distinctiveness of the endangered Kemp's ridley sea turtle. *Nature*, 1991, **352**:709~711.
- [31] Avise, J. C., B. W. Bowen, T. Lamb *et al.* Mitochondrial DNA evolution at a turtle's pace: evidence for low genetic variability and reduced microevolutionary rate in Testudines. *Mol. Biol. Evol.*, 1992, **9**:457~473.
- [32] Phillips, C. A., W. W. Dimmick, L. C. John. Conservation genetic of the common Snapping Turtle (*Chelydra serpentina*). *Conservation Biology*, 1996, **10**(2):397~405.
- [33] Paik, N. K., H. Y. Lee, E. K. Jung *et al.* Genetic differentiation of Mitochondrial DNA in the Genus, *E-laphe*. *Bulletin of the Institute for Basic Science*, 1992, **13**:75~83.
- [34] Waster, W., R. S. Thorpe. *Naja siamensis*, a cryptic species of venomous snake revealed by mtDNA sequencing. *Experientia*, 1994, **50**:75~79.
- [35] Arevalo, E., K. D. Scott, W. S. J. Jack. Mitochondrial DNA sequence divergence and phylogenetic relationships among eight chromosome races of the *Sceloporus grammicus* complex (Phrynosomatidae) in Central Mexico. *Syst. Biol.*, 1994, **43**:387~418.
- [36] Lahanas, P. L., M. M. Miyamoto, K. A. Bjorndal *et al.* Molecular evolution and population genetics of Greater Caribbean green turtles (*Chelonia mydas*) as inferred from mitochondrial DNA control region sequences. *Genetica*, 1994, **94**:57~67.
- [37] Pete, N. L., M. M. Miyamoto, K. A. Bjorndal *et al.* Molecular evolution and population genetics of Greater Caribbean green turtles (*Chelonia mydas*) as inferred from mitochondrial DNA control region sequence. *Genetica*, 1994, **94**:57~67.
- [38] Hedges, S. B., R. L. Bezy, L. R. Maxson. Phylogenetic relationships and biogeography of Xantusid Lizard, inferred from mitochondrial DNA sequences. *Mol. Biol. Evol.*, 1994, **8**(6):767~780.
- [39] Capriglione, T., A. Cardone, G. Onierma *et al.* Evolution of a centromeric satellite DNA and phylogeny of Lacertid Lizards. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1991, **100B**(3):641~645.
- [40] Bruna, E. M., R. N. Fisher, T. J. Case. Cryptic species of Pacific Skinks (*Emoia*) further support from mitochondrial DNA sequence. *Copeia*, 1995, (4):981~983.
- [41] Knight, A., D. Styer, S. Pelipan *et al.* Choosing among hypotheses of rattlesnake phylogeny: a best-fit rate test for DNA sequence data. *Syst. Biol.*, 1993, **42**(3):356~367.
- [42] Knight, A., D. P. Mindell. On the phylogenetic relationships of Colabrinæ, Elapidae and Viperidae and evolution of front-fanged venom system in snakes. *Copeia*, 1994, (1):1~9.
- [43] Wang, Y. Q., K. Y. Zhou, L. S. Su *et al.* The evolutionary relationships of several colubrid snakes suggested by sequences analysis of Cyt b gene fragment. *Acta Zoologica Sinica*, 1999, **45**(3):332~338.
- [44] Lamb, T., C. Lydeard, R. B. Walker *et al.* Molecular systematics of map turtles (*Graptemys*): a comparison of mitochondrial restriction site versus sequence data. *Syst. Biol.*, 1994, **43**(4):543~559.

- [45] Bickham , J. W. , T. Lamb , P. Minx *et al.* Molecular systematics of the genus *Clemmys* and the intergeneric relationships of Emydid turtles. *Herpetologica* , 1996 , **52** (1) 89~97.
- [46] 叶祥奎. 爬行动物的起源问题及其主要支序的进化. 两栖爬行动物学报 , 1983 2(1) : 1~7.
- [47] Arthur , L. ed. Reptiles of the Pacific World. New York : The Macmillan Company , 1946. 259~262.
- [48] Gatesy , J. , G. D. Amato. Sequence similarity of 12S rRNA ribosomal segment of mitochondrial DNAs of gharial and false gharial. *Copeia* , 1992(1) 241~243.