

基于 ISSR 标记和线粒体 Cyt b 基因分析 高原鼠兔的遗传多样性及其遗传分化

葛艳丽 林恭华 慈海鑫 张同作 唐利洲 苏建平*

(中国科学院高原生物适应与进化重点实验室 中国科学院西北高原生物研究所 西宁 810001;
中国科学院研究生院 北京 100049)

摘要:高原鼠兔 (*Ochotona curzoniae*) 是青藏高原的特有动物和关键种。本实验应用 ISSR 分子标记和细胞色素 *b* (Cytochrome *b*, Cyt *b*) 基因序列分析了雅鲁藏布江两岸高原鼠兔 4 个种群的遗传多样性和遗传分化。结果显示,两种标记所得到的 4 个种群的遗传多样性都较高,并以 Cyt *b* 基因为指标的遗传多样性水平在种群间体现出较大差异。在 ISSR 标记中,分子方差分析 (AMOVA) 表明种群间的遗传变异为 13.50%,种群分化较低且 UPGMA 聚类时江北岸与南岸的种群有交叉;而在 Cyt *b* 基因中遗传变异主要发生在种群间,占 79.24%,种群间存在着显著的遗传分化,且江北岸和南岸的两个种群分别聚为一类。研究结果表明,mtDNA 基因在反映种群遗传多样性和遗传分化上较 ISSR 分子标记相对具有优势。

关键词:高原鼠兔;ISSR;细胞色素 *b* 基因;遗传多样性;遗传分化

中图分类号:Q953 **文献标识码:**A **文章编号:**0250-3263(2009)04-34-07

Genetic Diversity and Differentiation of *Ochotona curzoniae* Based on ISSR and Cyt *b* Gene

GE Yan-Li LIN Gong-Hua CI Hai-Xin
ZHANG Tong-Zuo TANG Li-Zhou SU Jian-Ping*

(Key Laboratory of Adaptation and Evolution of Plateau Biota,
Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001;
Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: The Plateau Pika (*Ochotona curzoniae*) is endemic to the Qinghai-Tibetan Plateau and is a key species in the alpine meadow ecosystem. In this paper, genetic diversity and differentiation of four populations of Plateau Pika from both banks of the Brahmaputra River were assessed with inter-simple sequence repeat (ISSR) and Cyt *b* gene sequences. Our results showed that the genetic diversity of Plateau Pika was relatively high and there were much larger deviations among populations based on Cyt *b* gene than those based on ISSR marker. Analysis of molecular variance (AMOVA) in ISSR revealed a low level of genetic differentiation among the four populations. Of the total genetic variance, 13.50% was attributable to among-population variance, and the results of the UPGMA cluster analysis indicated that populations from north bank and south bank of the Brahmaputra River were intersectant. However, AMOVA in Cyt *b* gene indicated that 79.24% of the total genetic variance was explained by differences among the

基金项目 中国科学院知识创新工程领域前沿项目 (No. CXL Y-2002-3);

*通讯作者, E-mail: jpsu@nwipb.ac.cn;

第一作者介绍 葛艳丽,女,硕士研究生;研究方向:分子生态学;E-mail: geyanli4053586@163.com.

收稿日期:2008-12-22, **修回日期:**2009-05-18

four populations, and the UPGMA cluster of the four populations demonstrated that the populations from north bank and south bank were clustered into two single groups, respectively. Therefore, we suggest that Cyt b gene is a better marker than ISSR in reflecting the genetic diversity and genetic differentiation of populations.

Key words: Plateau Pika (*Ochotona curzoniae*); ISSR; Cytochrome b gene; Genetic diversity; Genetic differentiation

简单重复序列区间 (inter-simple sequence repeats, ISSR) 是在简单重复序列 (simple sequence repeats, SSR) 基础上创建的一种分子标记技术^[1]。该技术以加锚 SSR 寡聚核苷酸为引物,对位于反向排列的 SSR 之间的 DNA 序列进行 PCR 扩增,ISSR 具有简便、快捷、成本低、多态水平高等优点,是一种可用于分析动物的遗传多样性及遗传分化的分子标记技术^[2,3]。动物线粒体 DNA (mtDNA) 呈母系遗传,无重组发生,进化速率快,在种群遗传学分析中得到普遍应用^[4,5]。细胞色素 b (cytochrome b, Cyt b) 基因是线粒体 13 个蛋白质编码基因中结构及功能被研究得最为清楚的基因之一,且进化速度适中^[6],适合种群水平差异的检测。

高原鼠兔 (*Ochotona curzoniae*) 隶属于兔形目 (Lagomorpha) 鼠兔科 (Ochotonidae) 鼠兔属,是青藏高原的特有动物。目前国内外对高原鼠兔的研究涉及形态、生理、行为等各方面^[7-10],但用分子生物学技术来探讨高原鼠兔的遗传多样性和遗传分化等问题,目前仅有少量报道^[11,12]。本文拟结合 ISSR 和 Cyt b 基因序列这两种不同的分子标记对比分析高原鼠兔种群的遗传结构,以丰富高原鼠兔的分子生物学资料,并为进一步开展高原鼠兔的分子生物学研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 样本采集与总 DNA 提取 本研究样本分别采自雅鲁藏布江北岸的当雄纳木错、尼木续迈、雅鲁藏布江南岸的江孜热龙、浪卡子白地,共采集 4 个种群高原鼠兔 99 个样本,进行 ISSR 分析,并从这 4 个种群中随机挑出 38 个个体进行 Cyt b 基因序列分析(表 1,图 1)。野外采集后分别取肌肉组织,置于 95% 乙醇中固定保存^[13]。参照 Sambrook 等^[14]用苯酚/氯仿法提取基因组总 DNA, -20 °C 灭菌双蒸水保存备用。

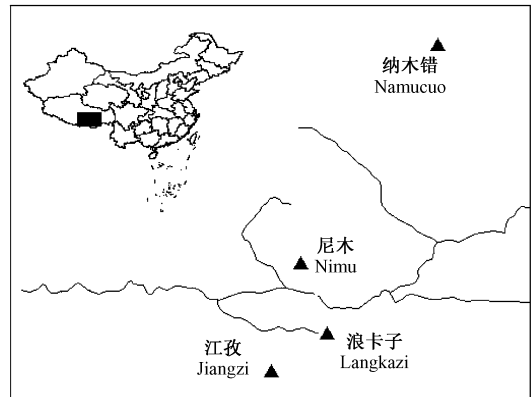


图 1 高原鼠兔 4 个采样区域的地理分布示意图

Fig. 1 Geographical location of four sampling sites of *Ochotona curzoniae*

表 1 高原鼠兔样地情况

Table 1 Sampling localities of *Ochotona curzoniae* populations

采样地 Locality	采样数 (ISSR/Cyt b) Sample size	经度 (°E) Longitude	纬度 (°N) Latitude	海拔 (m) Altitude
纳木错 Namucuo	27/8	91.035	30.721	4 807
尼木 Nimu	18/10	90.270	29.502	3 908
江孜 Jiangzi	18/10	90.101	28.901	4 660
浪卡子 Langkazi	36/10	90.417	29.110	4 425

1.2 ISSR 的 PCR 扩增及数据统计与分析 ISSR 引物由大连宝生物公司 (TaKaRa) 合成,实

验中使用了 5 条引物,分别为 UBC872 (5'-GAT AGA TAG ATA GAT A-3'), UBC868 (5'-GAA

GAA GAA GAA GAA GAA-3), UBC855 (5-ACA CAC ACA CAC ACA CYT-3), UBC808 (5-AGA GAG AGA GAG AGA GC-3), UBC807 (5-AGA GAG AGA GAG AGA GT-3)。在 25 μ l 的反应体系中模板 40 ~ 60 ng、 Mg^{2+} 浓度 1.5 mmol/L、dNTP 浓度 0.2 mmol/L、*Taq* 酶 1.25 U、引物浓度 1.5 μ mol/L。实验的 PCR 扩增程序为 94 预变性 4 min; 94 变性 45 s, 47 ~ 61 退火 45 s, 72 延伸 90 s, 37 个循环; 循环结束后 72 延伸 7 min, 4 保存。扩增产物在 1.2% 的琼脂糖凝胶(含 0.5 g/ml 溴化乙锭)中电泳, 用 200 bp DNA ladder (200 ~ 4 000 bp) 作为相对分子质量标准, 电压不超过 5 V/cm, 电泳缓冲液为 1 \times TAE, 在自动凝胶成像系统上观察并拍照记录。

对照反应产物在凝胶上的对应位置, 有带记为“1”, 无带记为“0”, 得到 ISSR 分析的原始数据矩阵。用 POPGENE32 计算出总体水平及种群水平的等位基因数 (N_a), 有效等位基因数 (N_e), Nei's 基因多样性 (H), Shannon 信息指数 (I), 多态带比率 (PPB)。采用软件包 TFGA1.3 分别计算种群间的遗传距离 (D)^[15], UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) 聚类分析, 并利用 WINAMONAL.5^[16] 软件进行分子方差分析 (analysis of molecular variance, AMOVA), 计算种群内、种群间的变异方差分布。

1.3 Cyt b 基因的扩增、测序、序列比对及数据分析 PCR 扩增引物为 L14724 (5-CGA ACC TTG ATA TGA AAA ACC ATC GTT G-3) 和 H15915 (5-CGG AAT TCC ATT TTT GGT TTA CAA GAC-3)^[17]。反应体系为 30 μ l, 包括 1 \times PCR buffer (TaKaRa), 1.0 U *Taq* DNA 聚合酶 (TaKaRa), 2.5 mmol/L $MgCl_2$, 0.5 mmol/L dNTPs, 两条引物各 0.4 μ mol/L, 40 ~ 60 ng 模板 DNA。反应条件: 95 预变性 8 min; 95 变性 45 s, 55 ~ 57 复性 45 s, 72 延伸 80 s, 35 个循环; 最后 72 延伸 7 min。扩增产物用柱式 PCR 产物纯化试剂盒(上海生工)进行纯化。测序工作由北京华大基因公司完成。

利用软件 Clustal X^[18] 参照北美鼠兔 (*O.*

princeps) Cyt b 序列 (GenBank 号: AY292716) 进行序列比对、剪切。通过 AWA 程序(中国科学院高原生物适应与进化重点实验室), 统计单倍型分布和单倍型数目 (number of haplotypes, N)。利用 DnaSP 4.0^[19] 计算序列变异位点数、单倍型多样性 (h) 和核苷酸多样性 (π), 以评价种群遗传多样性水平。通过 Arlequin Ver 3.0^[20] 统计多态位点数 (number of polymorphic sites, S), 并用其中的 AMOVA 分析方法估算遗传分化在种群间及种群内的分布情况。利用 MEGA 4.1^[21] 中的 Kimura 双参数模型计算遗传距离。根据种群间的遗传距离, 采用 UPGMA 进行聚类分析。

2 结果

2.1 高原鼠兔的遗传多样性

2.1.1 ISSR 遗传多样性结果 5 条引物对 4 个高原鼠兔种群的所有 DNA 样品进行 ISSR 扩增, 共获得 60 条清晰稳定的条带(条带大小 175 ~ 2 500 bp), 每条引物扩增出的条带为 8 ~ 18 条不等(图 2)。各种群的遗传多样性分析结果见表 2, 在总体水平上, Nei's 基因多样性 (H) 是 0.230 6, Shannon 信息指数 (I) 是 0.353 1, 多态带百分比为 75%。各种群间的遗传多样性差别不大。

2.1.2 Cyt b 遗传多样性结果 通过 PCR 扩增、测序及比对, 获得了 38 个高原鼠兔个体的 Cyt b 基因序列, 全长均为 1 140 bp。经软件分析, 1 140 个位点中, 共检测到 70 个变异位点, 占所测序列长度的 6.14%。AWA 分析共检测到 15 种单倍型。其中, 纳木错与尼木间有 1 个共享单倍型, 江孜与浪卡子间有 2 个共享单倍型。高原鼠兔 Cyt b 基因序列分析结果见表 3, 在总体水平上这 4 个种群的遗传多样性较高。

2.2 高原鼠兔的遗传分化 ISSR 的 AMOVA 分析表明, 种群内的变异占主导地位

Yeh F C, Yang R C, Boyle T, et al. POPGENE version 1.31. Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis. University of Alberta and Centre for International Forestry Research, 1999.

Miller M P. Tools for population genetic analyses version 1.3: A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Download from <http://www.bioweb.usu.edu/mpmbio/tfga.htm>, 1997.

(86.50%) ,而种群间的遗传变异为 13.50% ,种群之间表现出较低水平的遗传分化 ($P < 0.01$) 。Cyt b 基因序列的 AMOVA 分析表明,遗

传变异主要发生在种群之间,占 79.24% ,种群内的变异只占 20.76% ,高原鼠兔各种群间存在着显著的遗传分化 ($P < 0.0001$) 。

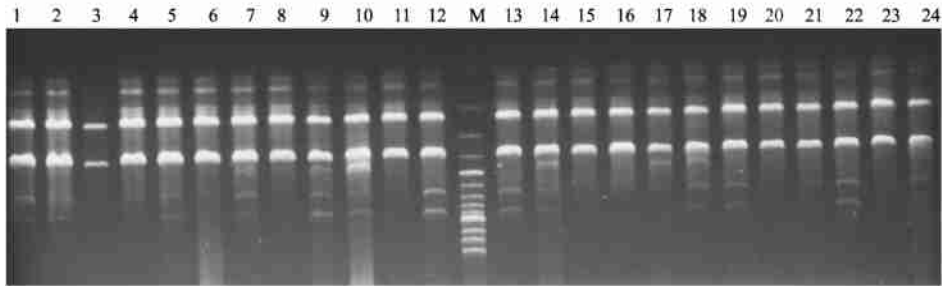


图 2 引物 UBC872 对纳木错种群 24 份鼠兔样品的 ISSR PCR 扩增结果
 Fig.2 The profile of ISSR PCR amplification using UBC872 primer in 24 samples of *Ochotona curzoniae* from Namucuo population
 M. 200 bp DNA 分子量标准。M. 200 bp DNA ladder.

表 2 ISSR 中 4 个种群的遗传多样性
 Table 2 Statistical analysis of genetic diversities of four populations in ISSR

种群 Population	等位基因 Observed number of alleles	有效等位基因数 Effective number of alleles Nei 's	基因多样性 Nei 's gene diversity	Shannon 信息指数 Shannon 's information index	多态带数 Number of polymorphic bands	多态带百分比 Percentage of polymorphic bands (%)
纳木错 Namucuo	1.750 0 ±0.436 7	1.367 7 ±0.362 0	0.220 4 ±0.188 9	0.338 5 ±0.262 3	45	75.00
尼木 Nimu	1.600 0 ±0.494 0	1.302 9 ±0.342 8	0.184 6 ±0.187 8	0.283 5 ±0.269 8	36	60.00
江孜 Jiangzi	1.600 0 ±0.494 0	1.305 7 ±0.344 7	0.185 4 ±0.189 6	0.284 1 ±0.271 7	36	60.00
浪卡子 Langkazi	1.716 7 ±0.454 4	1.322 0 ±0.341 0	0.198 0 ±0.182 3	0.308 3 ±0.257 2	43	71.67
总体水平 Total	1.800 0 ±0.403 4	1.387 7 ±0.364 9	0.230 6 ±0.190 6	0.353 1 ±0.261 9	45	75.00

表 3 Cyt b 中 4 个种群的遗传多样性
 Table 3 Statistical analysis of genetic diversities of four populations in Cyt b

	种群 Population				总体水平 Total
	纳木错 Namucuo	尼木 Nimu	江孜 Jiangzi	浪卡子 Langkazi	
单倍型数目 Number of haplotypes	4	5	2	7	15
单倍型 Haplotype	H8 H9 H10 H15	H11 H12 H13 H14 H15	H3 H6	H1 H2 H3 H4 H5 H6 H7	
多态位点数 Number of polymorphic loci	3	22	2	64	91
单倍型多样性 Haplotype diversity	0.750 0 ±0.139 1	0.666 7 ±0.163 3	0.355 6 ±0.159 1	0.911 1 ±0.077 3	0.865 ±0.037
核苷酸多样性 Nucleotide diversity	0.000 82 ±0.000 71	0.003 86 ±0.002 35	0.000 62 ±0.000 58	0.018 71 ±0.010 22	0.024 8 ±0.000 91

表 4 为 ISSR 标记和 Cyt b 基因序列分析中 4 个种群间的遗传距离。在 ISSR 中,两两种群

间的遗传距离为 0.036 2 ~ 0.060 4。在 Cyt *b* 中,两两种群间的遗传距离为 0.003 ~ 0.048。根据遗传距离得到的聚类情况见图 3。

表 4 4 个种群间的遗传距离

Table 4 Genetic distances among four populations

种群 Population	纳木错 Namucuo	尼木 Nimu	浪卡子 Langkazi	江孜 Jiangzi
纳木错 Namucuo		0.053 4	0.036 2	0.052 4
尼木 Nimu	0.003		0.038 2	0.060 4
浪卡子 Langkazi	0.040	0.040		0.039 5
江孜 Jiangzi	0.048	0.047	0.011	

上三角为 ISSR 遗传距离;下三角为 Cyt *b* 遗传距离。

Genetic distance of ISSR (above diagonal); Genetic distance of Cyt *b* (below diagonal).

3 讨论

3.1 高原鼠兔的遗传多样性 分子标记作为生态学研究工具,在种群遗传多样性和遗传分化分析中发挥着越来越重要的作用^[22]。在 ISSR 标记中,遗传多样性常以 Nei's 基因多样性(H)和 Shannon 信息指数(I)为指标^[23]。在

Cyt *b* 基因中,遗传多样性常用单倍型多样性(h)、核苷酸多样性(π)来度量^[24]。本文结合 ISSR 标记和 Cyt *b* 基因序列对高原鼠兔 4 个种群的分析显示,高原鼠兔种群的遗传多样性水平较高。在 ISSR 标记中,4 个种群的遗传多样性大小顺序为纳木错 > 浪卡子 > 江孜 > 尼木,但多样性水平差别不大(H 和 I 的最高值都分别只是最小值的 1.2 倍)。在 Cyt *b* 基因序列中,4 个种群的 h 值大小顺序为浪卡子 > 纳木错 > 尼木 > 江孜, π 值大小顺序为浪卡子 > 尼木 > 纳木错 > 江孜,其中纳木错的遗传多样性地位在 h 与 π 两种指标上不一致。由于单个碱基的变异可以生成新的单倍型,但对核苷酸多样性影响却较小,核苷酸多样性的提高需要更长时间的积累,因此,对衡量种群多样性更具代表性。以 π 值作为衡量群体多态程度的重要指标不难看出,这 4 个种群的遗传多样性高低的差别很大,最高的 π 值是最小的 π 值的 30 倍。这样看来,Cyt *b* 基因在分析种群遗传多样性上可能比 ISSR 标记更敏感。

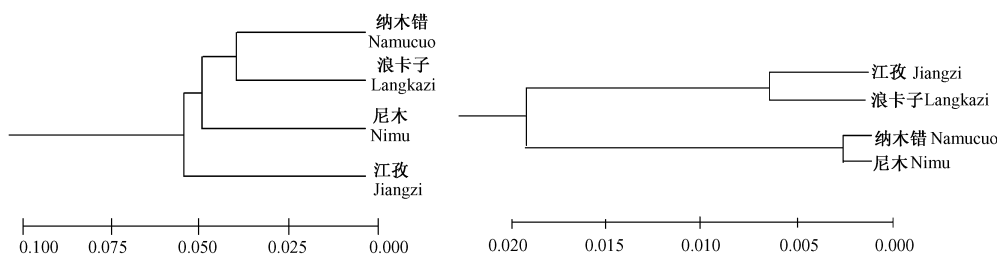


图 3 4 个种群的 UPGMA 聚类图

Fig. 3 UPGMA clustering graph of four populations

左边为 ISSR 结果,右边为 Cyt *b* 基因结果。Left: Result of ISSR; Right: Result of Cyt *b* gene.

3.2 高原鼠兔种群的遗传分化 种群的遗传结构受一系列因素的影响,包括物种自身的繁殖方式、自然选择、物种分布范围、基因流等。在用 ISSR 和 Cyt *b* 基因分析种群的遗传分化时,这两种标记同样存在着巨大差异。ISSR 的 AMOVA 分析表明,高原鼠兔的遗传变异主要发生在种群内,种群间分化小;雅鲁藏布江同侧种群间平均遗传距离(0.046 5)略低于异侧种群间的平均遗传距离(0.046 8),江南北两岸的种

群分化不明显。根据各种群间遗传距离进行 UPGMA 聚类分析的结果,江南岸的浪卡子和江北岸的纳木错首先聚为一类,然后再与北岸的

缙敬轩. 川金丝猴 (*Rhinopithecus roxellanae*) 种群遗传结构和分子系统地理学初步研究. 西安:西北大学硕士学位论文,2004.

宋江平. 我国两种石鸡杂交带种群的 ISSR 分析. 兰州:兰州大学硕士学位论文,2007.

尼木聚为一类,南岸的另一个种群江孜则相对独立。这进一步表明在 ISSR 标记上雅鲁藏布江对这 4 个高原鼠兔种群的基因交流没有明显的隔离作用。然而已有许多研究表明,由于河流的阻隔作用使许多生物的种群之间的基因交流受到限制,从而导致种群之间产生一定程度的遗传分化。Castella^[25] 等对分布于直布罗陀海峡两岸的鼠耳蝠 (*Myotis myotis*) 的研究表明,同岸种群之间的遗传分化很小,异岸种群之间则遗传分化很显著。Eriksson^[26] 等的研究也表明,对于大型的活动能力强的倭黑猩猩 (*Pan paniscus*) 而言,非洲刚果河对其遗传结构也产生了很大影响,被河流隔开的不同种群间的分化很显著。本研究中从 Cyt b 基因分析的结果也发现了与之相符的结论。Cyt b 基因标记的 AMOVA 分析表明,高原鼠兔的遗传变异主要发生在种群间,且雅鲁藏布江同侧种群间平均遗传距离(0.007)远远低于异侧种群间的平均遗传距离(0.044),江两岸种群间的遗传分化较大,而 UPGMA 聚类分析也明确地将江两岸的种群各聚为一类,这表明在 Cyt b 基因水平上雅鲁藏布江对高原鼠兔种群产生了明显的隔离作用。

本文在对高原鼠兔的遗传结构进行的初步分析中,ISSR 标记和线粒体 Cyt b 基因得出的结果存在着差异,尤其是 Cyt b 基因中雅鲁藏布江两岸的种群存在着明显的遗传分化,而 ISSR 标记中却没有体现出来。这可能与这两种分子标记本身具有的特点相关。ISSR 标记是核基因标记,核基因是双性遗传基因,任何一种性别的个体发生迁移都会产生基因流,且核基因在遗传过程中不断进行重组,放大基因间交流的程度,从而减弱种群之间的分化水平。而线粒体基因是母系遗传,只有在雌性个体迁移的情况下才会产生种群间的基因流,且 mtDNA 不发生重组,通常能够全面地反映种群内和种群间的遗传变异^[27]。因此本文认为 mtDNA 基因在反映种群遗传多样性和遗传分化上较 ISSR 分子标记相对具有优势。另外,本研究中采集的高原鼠兔的种群数和样本量偏少,

这可能对 Cyt b 基因反映种群间的遗传差异产生影响,且对更适合大样本检测的 ISSR 标记而言,5 条引物的 60 个位点所提供的信息量也是不太充足,这可能会降低 ISSR 数据分析时的准确性。在今后的研究中,还应扩大采样量并进一步筛选更多的 ISSR 标记,对高原鼠兔种群的遗传结构进行更充分的分析。

参 考 文 献

- [1] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 1994, **20**(2): 176 ~ 183.
- [2] Srivastava P P, Kar P K, Awasthi A K, et al. Identification and association of ISSR markers for thermal stress in polyvoltine silkworm *Bombyx mori*. *Russian Journal of Genetics*, 2007, **43**(8): 858 ~ 864.
- [3] Dusinsky R, Kudela M, Stloukalova V, et al. Use of inter-simple sequence repeat (ISSR) markers for discrimination between and within species of blackflies (Diptera: Simuliidae). *Biologia*, 2006, **61**(3): 299 ~ 304.
- [4] Zhang S M, Wu Q J, Zhang Y P. On the taxonomic status of Asian and American green sturgeon (*Acipenser medirostris*) inferred from mitochondrial control region sequences. *Acta Zoologica Sinica*, 2001, **47**(6): 632 ~ 639.
- [5] 刘文娟,刘通发.基于线粒体 Cyt b 基因的雉鸡甘肃亚种的种群遗传结构. *动物学报*, 2008, **54**(2): 225 ~ 232.
- [6] Ding S X, Zhuang X, Guo F, et al. Molecular phylogenetic relationships of China Seas groupers based on cytochrome b gene fragment sequences. *Science in China Series C: Life Sciences*, 2006, **49**: 235 ~ 242.
- [7] 张堰铭,张知彬,魏万红等.高原鼠兔领域行为时间分配格局及其对风险环境适应的探讨. *兽类学报*, 2005, **25**(4): 333 ~ 338.
- [8] 杨洁,赵新全,郭松长等.高原鼠兔 ob 基因的组织表达特征. *兽类学报*, 2007, **27**(1): 33 ~ 38.
- [9] Lai C H, Smith A T. Keystone status of plateau pikas (*Ochotona curzoniae*): effect of control on biodiversity of native birds. *Biodiversity and Conservation*, 2003, **12**: 1901 ~ 1912.
- [10] Wang J M, Zhang Y M, Wang D H. Seasonal thermogenesis and body mass regulation in plateau pikas (*Ochotona curzoniae*). *Ecophysiology*, 2006, **149**: 373 ~ 382.
- [11] Yu N, Zheng C L, Zhang Y P, et al. Molecular systematics of Pikas (Genus *Ochotona*) inferred from mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2000, **16**(1): 85 ~ 95.

- [12] 周乐,杨生妹,于智勇等. 高原鼠兔四个地理种群的遗传多样性与遗传分化. *兽类学报*,2007,**27**(3):221~228.
- [13] 蔡振媛,张同作,连新明等. 一种提取动物基因组总DNA的野外样品保存方法. *四川动物*,2006,**25**(3):473~477.
- [14] Sambrook J, Russell D W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Third edition). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press,2001,463~470.
- [15] Nei M. Genetic distance between populations. *American Naturalist*,1972,**6**:283~292.
- [16] Excoffier L, Smouse P E, Quattro J M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*,1992,**131**:479~491.
- [17] Kocher T D, Thomas W K, Meyer A, *et al.* Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. *PNAS*,1989,**86**:6 196~6 200.
- [18] Thompson J D, Gibson TJ, Plewniak F, *et al.* The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*,1997,**25**(24):4 876~4 882.
- [19] Rozas J, Sanchez-DelBarrio J C, Messeguer X, *et al.* DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*,2003,**19**:2 496~2 497.
- [20] Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*,2005,**1**:47~50.
- [21] Kumar S, Nei M, Dudley J, *et al.* MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in Bioinformatics*,2008,**9**(4):299~306.
- [22] Parker P G, Snow A A, Schug M D, *et al.* What molecular markers can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. *Ecology*,1998,**79**:361~382.
- [23] 邹喻苹,葛颂,王晓东. 系统与进化植物学中的分子标记. 北京:北京科学出版社,2001.
- [24] Tajima F. Evolutionary relationship of DNA sequences infinite populations. *Genetics*,1983,**105**:437~460.
- [25] Castella V, Ruedi M, Excoffier L, *et al.* Is the Gibraltar Strait a barrier to gene flow for the bat *Myotis myotis* (Chiroptera: Vespertilionidae)? *Molecular Ecology*,2000,**9**(11):1 761~1 772.
- [26] Eriksson J, Hohmann G, Boesch C, *et al.* Rivers influence the population genetic structure of bonobos (*Pan paniscus*). *Molecular Ecology*,2004,**13**(11):3 425~3 435.
- [27] Avise J C. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. New York: Chapman & Hall,1994,1~9.