

中国大鲵5个野生种群的 AFLP 分析*

杨丽萍^{1,2}, 蒙子宁¹, 刘晓春¹, 张 勇¹, 黄俊海³, 黄 景³, 林浩然^{1,4}
(1. 中山大学水生经济动物研究所//广东省水生经济动物良种繁育重点实验室, 广东 广州 510275;
2. 西南林业大学云南省森林灾害预警与控制重点实验室, 云南 昆明 650224;
3. 珠海金鲵野生动物养殖有限公司, 广东 珠海 519015;
4. 海南大学海洋学院, 海南 海口 570228)

摘要: 采用 AFLP 技术对中国大鲵四川、贵州、湖北、陕西及河南五个野生种群的遗传多样性和遗传分化水平进行了评估。9 对引物组合在 5 个野生种群中共扩增出 507 条带, 其中多态性条带为 354。多态位点比例 (69.82%)、香农信息指数 (0.362 9) 和基因多样性指数 (0.241 4) 等参数均较高, 显示中国大鲵遗传多样性水平较为丰富。AMOVA 分析发现, 中国大鲵遗传多样性绝大部分位于种群内 (97.94%)。种群间遗传分化较弱 ($\Phi_{st} = 0.021$, $P < 0.001$)。根据种群间遗传距离构建的 UPGMA 树基本依照流域进行聚类, 结合化石证据, 推测中国大鲵由北向南进行扩散。

关键词: 中国大鲵; 遗传多样性; 遗传分化; AFLP; 系统地理学

中图分类号: Q38 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2011) 02-0099-06

AFLP Analysis of Five Natural Populations of *Andrias davidianus*

YANG Liping^{1,2}, MENG Zining¹, LIU Xiaochun¹, ZHANG Yong¹,
HUANG Junhai³, HUANG Jing³, LIN Haoran^{1,4}

- (1. Institute of Aquatic Economic Animals // Guangdong Provincial Key Laboratory for Aquatic Economic Animals, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China;
2. Yunnan Provincial Key Laboratory of Forest Disaster Warning and Control, Southwest Forestry University, Kunming, 650224, China;
3. Doumen Golden salamander Aquatic Technology Limited Company, Zhuhai 519100, China;
4. Ocean College, Hainan University, Haikou 570228, China)

Abstract: Genetic diversity and differentiation of natural populations of *Andrias davidianus* in Sichuan, Guizhou, Hubei, Shanxi and Henan was comprehensively determined using AFLP markers. Sixty individuals from five natural populations were used in AFLP analyses. Nine primer pairs in AFLP analyses produced 507 scorable bands, of which 354 were polymorphic. Three genetic diversity parameters; the percentage of polymorphic loci (69.82%), the Shannon's information index (0.362 9) and the Gene diversity (0.241 4) all indicated that *A. davidianus* was with substantial variation. High level of genetic diversity of *A. davidianus* agreed with its life history traits and geographical distribution. Most of genetic diversity resided within populations (97.94%) in AMOVA analyses. A low genetic differentiation was characterized by Φ_{st} ($\Phi_{st} = 0.021$, $P < 0.001$). In the UPGMA dendrogram based on the genetic distance, *A. davidianus* populations were separated into two major clusters. *A. davidianus* was supposed to

* 收稿日期: 2010-04-01

基金项目: 广东省科技计划资助项目 (2004B26001183); 广东省教育部产学研结合资助项目 (2006D90204002); 中山大学青年教师科研启动基金资助项目

作者简介: 杨丽萍 (1980 年生), 女, 讲师; 通讯作者: 林浩然; E-mail: lsslhr@mail.sysu.edu.cn

disperse southward from north with the salamander fossil proof.

Key words: *Andrias davidianus*; genetic diversity; genetic differentiation; AFLP; Phylogeography

物种种群间遗传分化产生原因通常可通过系统地理学研究获得。系统地理学是研究物种及物种内不同种群现有分布格局的历史成因和演化过程的一门学科。许多自身迁徙力较差物种, 由于地理分隔以及人为影响等造成的基因流阻断, 随着时间的积累产生了种内(亚种群)遗传差异。因而, 地理格局往往可以反映种内亚种群之间的遗传关系^[1]。两栖类生活史特殊, 对水环境依赖性很强, 自身扩散能力又非常有限, 当环境变化时很难迁徙至合适地区, 因此两栖类的群体遗传结构通常可以反映相应历史事件^[2]。有研究发现, 赤背蝾螈 *Plethodon cinereus* 和俄勒冈陆巨蝾螈 *Dicamptodon tenebrosus* 的种群遗传分化与片段化分布之间存在联系^[3-4]。

中国大鲵 *Andrias davidianus* 隶属于两栖纲 Amphibia, 有尾目 Caudata, 隐鳃鲵科 Cryptobranchidae, 大鲵属 *Andrias*, 是中国特有的珍稀濒危物种, 广泛分布于长江、黄河及珠江中下游支流中, 遍及华中、华南和西南等 17 个省区^[5]。中国大鲵具有终身水栖的生理特性, 因而难以越过陆地迁徙, 其遗传分化很可能与流域分布相关联。然而, 近期报道却显示二者之间关联性不强^[6-8]。这些研究主要使用了线粒体编码基因序列和同工酶方法, 所分析的样品总数在 13-28 尾。样品数目偏少很可能无法反应物种真实的遗传结构, 因此有必要采用新方法, 扩大样品量进一步进行中国大鲵遗传分化与系统地理学的研究。

新型分子标记 AFLP, 融合了 RFLP 的可重复性和 RAPD 的简便性, 具有信息量大、灵敏度高、多态性丰富和重复性好等优点^[9]。早期 AFLP 分析主要应用于植物领域^[10], 随后逐步拓展到动物领域, 目前已广泛应用于黑真蝾螈 *Salamandra atra*、日本大鲵 *A. japonicus* 和草莓箭毒蛙 *Dendrobates pumilio* 等两栖类遗传结构分析及保护遗传学研究^[11-13]。

本研究拟利用 AFLP 技术进一步分析中国大鲵五个地理种群遗传多样性和遗传分化, 并联系相关历史地理事件, 对中国大鲵种群的遗传结构特点及其历史成因进行探讨, 旨在获得中国大鲵种群的遗传多样性资料, 以及遗传分化与环境间的相互关系, 为合理利用大鲵种质资源提供遗传背景资料。

1 材料和方法

1.1 实验材料及 DNA 提取

中国大鲵各地理种群样品由珠海斗门金鲵水产科技有限公司在各原产地获得, 采样地及所属流域见表 1 和图 1, 包括 5 个种群共 60 个个体。剪取尾部少量肌肉组织, 置于液氮保存, 运回实验室后放入 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰柜备用。

取出保存备用的大鲵肌肉样品, 剪取约 50 mg 组织, 采用常规酚-氯仿抽提法提取基因组 DNA。 $w = 0.8\%$ 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的完整性, Eppendorf 分光光度计测定 DNA 纯度与浓度。

1.2 AFLP 扩增及数据分析

AFLP 扩增参照 Vos 等^[14]所报道的方法并做略微改动。基因组 DNA 用 *EcoRI* 和 *Mse I* $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 双酶切 10 h, 加入接头混合物后于 $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜。用带有 1 个选择性碱基的引物 (E-A, M-C) 进行预扩增。少量预扩增产物用于电泳检测, 剩余样品经灭菌水稀释 10 倍后作为选择性扩增模板。使用带有 3 个选择性碱基的引物进行选择扩增。扩增产物经 $w = 4.5\%$ 变性聚丙烯酰胺凝胶分离后, 通过银染法显带。以扩增条带数目适中、分布均一和多态性高为标准, 从 96 对引物组合中筛选出 9 对引物组合 (E-AAC/M-CGT、E-ACA/M-CAC、E-ACT/M-CGA、E-ATC/M-CGA、E-ATC/M-CTT、E-ATG/M-CGT、E-ATG/M-CGA、E-ACA/M-CGA 和 E-AGA/M-CGA) 用于本研究。AFLP 操作流程中所用药品均购自上海生工生物工程技术有限公司 (Shanghai Sangon), PCR 仪为 PTC-200 扩增仪 (Bio-RAD)。

1.3 数据分析

电泳图谱中的每条 DNA 谱带记为一个位点, 只记录电泳后可辨认的条带。当某一扩增带出现时记为 1, 缺失记为 0, 从而建立原始谱带矩阵。

利用种群遗传学软件 POPGENE1.32 对“1/0”矩阵进行处理, 统计多态位点百分率、基因多样性和香农信息指数等遗传参数, 评估中国大鲵五个地理种群的遗传多样性水平。

通过 WINAMOVA v 1.55 软件, 依据 AMOVA (analysis of molecular variance) 方法计算居群内和居群间的遗传变异、Fst 类似物 Φ_{st} (Φ_{st}) 和遗传距离。通过 MEGA 3.1 软件对种群间遗传距离构

建 UPGMA 系统进化树。

表 1 采样点及样本信息

Table 1 Information of Samples and localities

群体 population	地点 Location	水系 Drainage	样本量 Sample size
河南 Henan	卢氏县 (111.03°E, 34.06°N) Lushi County	黄河 Yellow River, YL	12
陕西 Shaanxi	汉中市 (108.0° E 4, 33.07° N) Hanzhong	长江 Yangtze River, YZ	12
湖北 Hubei	十堰市 (110.79° E, 32.65° N) Shiyan	长江 Yangtze River, YZ	12
贵州 Guizhou	龙里县 (106.98° E, 26.46° N) Longli County	长江 Yangtze River, YZ	12
四川 Sichuan	泸州市 (105.39° E, 28.91° N) Luzhou	长江 Yangtze River, YZ	12

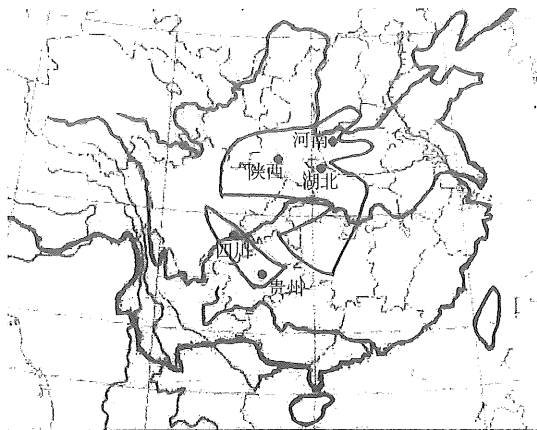


图 1 中国大鲵种群样品的采样地 (黑色圆点表示)

Fig. 1 Map showing the location of Chinese giant salamander populations examined in this study characterized as black dots (黑色闭合线圈表示取样地所在的中国大鲵自然分布区^[15])

2 结果

2.1 遗传多样性

9 对引物在中国大鲵 5 个种群 60 个样品中共检测到 507 个位点, 其中多态位点数为 354 个, 多态位点比例为 69.82%, 片段大小在 100 ~ 1 300 bp 之间。图 2 列举了 E-ATG/M-CGA 引物组合对各地种群进行 AFLP 扩增的电泳图结果。中国大鲵 5 个种群总的多态位点比例、香农信息指数和基因多样性指数分别为 69.82%, 0.362 9 和 0.241 4。其

中 5 个地理种群的多态位点比例呈贵州 > 陕西 > 河南 > 四川 > 湖北的递减 (见表 2)。贵州种群的香农信息指数和基因多样性指数最高, 分别为 $0.281 1 \pm 0.013 8$ 和 $0.194 6 \pm 0.009 7$; 湖北种群的香农信息指数 ($0.226 6 \pm 0.013 3$) 和基因多样性指数 ($0.156 3 \pm 0.009 3$) 最低, 其变化趋势与多态位点比例相同 (见表 2)。

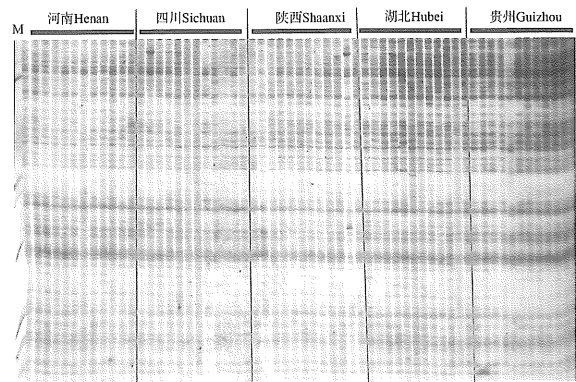


图 2 引物组合 E-ATG/M-CGA 对中国大鲵 5 个种群 AFLP 扩增的部分带谱

Fig. 2 A portion of an AFLP gel with primer E-ATG/M-CGA

表 2 中国大鲵 5 个野生种群多态位点比例、香农信息指数和基因多样性指数

Table 2 Percent of polymorphic loci, Shannon information index and gene diversity within five nature populations of *A. davidianus*

种群	多态位点比例	香农信息指数	基因多样性指数
河南	41.22%	$0.243 8 \pm 0.013 5$	$0.168 2 \pm 0.009 5$
四川	40.63%	$0.245 7 \pm 0.013 5$	$0.170 0 \pm 0.009 5$
陕西	44.38%	$0.261 4 \pm 0.013 6$	$0.180 1 \pm 0.009 5$
湖北	37.67%	$0.226 6 \pm 0.013 3$	$0.156 3 \pm 0.009 3$
贵州	46.94%	$0.281 1 \pm 0.013 8$	$0.194 6 \pm 0.009 7$
总计	69.82%	0.362 9	0.241 4

2.2 遗传分化与遗传距离

通过 AMOVA 方法对各种群遗传变异进行了分析, 结果显示, 有 97.94% 的变异存在于种群内, 仅有 2.06% 的变异存在于种群间。AMOVA 分析得到遗传分化参数 Φ_{st} 为 0.021 ($P < 0.001$), 显示种群间遗传分化较小。

种群间的遗传距离分布于 0.004 6 ~ 0.040 8 (表 3)。其中, 贵州与四川种群之间遗传距离最小, 为 0.004 6, 而湖北与河南种群之间遗传距离最大, 达到 0.040 8。

采用种群间遗传距离构建了 UPGMA 树 (见图

3)。系统树主要分为两大支,一支由黄河流域河南种群组成;另一支由长江流域四川、贵州、湖北和陕西种群组成,其中属于长江中游段重要支流汉江水系的陕西和湖北两个种群聚类,属于长江上游段的四川种群和贵州种群聚类。基本依照流域进行聚类。系统进化树中最早分出的是位于中国北部的河南种群;地处中国中部的湖北和陕西种群先于位于南部的贵州和四川种群分出。进化地位的老性关系体现为北部 > 中部 > 南部。

表 3 中国大鲵 5 个野生种群间遗传距离

Table 3 The genetic distance among five nature populations of Chinese giant salamander

	河南	四川	陕西	湖北	贵州
河南	-				
四川	0.019 0	-			
陕西	0.018 5	0.016 1	-		
湖北	0.040 8	0.034 5	0.007 6	-	
贵州	0.040 1	0.004 6	0.015 9	0.011 5	-

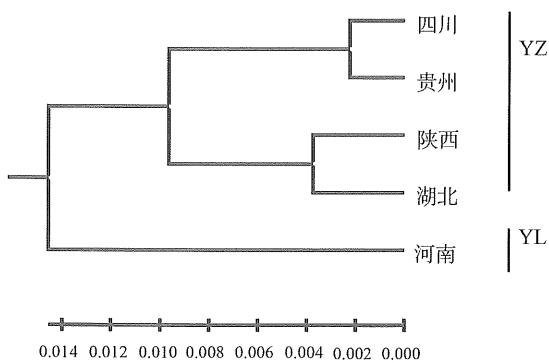


图 3 基于种群间遗传距离构建的 UPGMA 树

Fig. 3 The UPGMA tree based on the modified genetic distance among populations

3 讨论

3.1 中国大鲵野生种群遗传多样性分析

从进化观点来看,中国大鲵是由 3 亿 6 千万年前古生代泥盆纪时期水生鱼类演变而成的古老两栖动物,对探讨脊椎动物由水生到陆生的演变具有关键性的意义。为阐明中国大鲵的遗传背景,本研究将中国大鲵与其近缘物种以及进化历程相近的物种进行了遗传多样性的比较。

本研究 AFLP 分析得到的中国大鲵种群多态位点比例 (P) 为 69.82%, 基因多样性指数 (H) 为 0.241 4。中国大鲵的遗传多样性高于施氏巴鲵

Liua shihi (H : 0.154 0)^[16], 但低于俄勒冈陆巨鲵 (H : 0.309 4) 和赤背蝾螈 (H : 0.246 0)^[3-4]。上述两种鲵类基因多样性低于两种蝾螈类相应遗传参数,从栖息生境来看,所比较的两种鲵类为终身水栖,而两种蝾螈类均为成体陆栖。Nevo 等^[17]在对两栖类进行等位酶分析时发现,陆栖生物相比水栖生物具有更高的遗传多样性,这与陆栖生物具有相对较广的生境宽度 (niche breadth) 和更高的生态稳定性 (ecological stability) 等有关。此外,将中国大鲵与其进化历程相近的一些古老物种进行比较,中国大鲵的遗传多样性均高于所比较的巴西蛇颈龟 *Hydromedusa maximiliani* (P : 37.00%)^[18]、北美食鼠蛇 *Elaphe obsoleta* (P : 35.00%) 和扬子鳄 *Alligator sinensis* (P : 58.50%)^[19-20]。遗传多样性参数均揭示中国大鲵遗传多样性较为丰富,这与其生活史特征及地理分布相一致。中国大鲵一般 3~5 龄性成熟,生活史长达 100 多年,较大的年龄结构差异容易维持较高的遗传多样性水平^[21]。此外,中国大鲵分布区域遍及中国 17 个省区,在暖温带、亚热带不同气候条件下均有分布。分布区域较广也是其遗传多样性较高的一个原因。遗传多样性是物种长期进化的产物,与物种适应能力、生存能力和进化潜力密切相关。由此可见中国大鲵这一古老物种能够历经几亿年自然环境和气候的变化存活至今,与其具有较高的遗传多样性有一定的关系。

中国大鲵 5 个地理种群的多态位点比例由高到低依次为贵州 (46.94%) > 陕西 (44.38%) > 河南 (41.22%) > 四川 (40.63%) > 湖北 (37.67%)。大鲵在上述 5 个取样地均呈现集中分布。陕西省太白县渭水河设有国家级中国大鲵自然保护区,地理位置处于汉江上游,位于陕西汉中之上。贵州龙里所处的乌江水系上游也设有中国大鲵自然保护区。河南卢氏县建有省级中国大鲵自然保护区。贵州、陕西和河南种群遗传多样性相对较高,可能与自然保护区对中国大鲵野生种群的保护效果较好有关。

大鲵的人工养殖于 20 世纪 70 年代开始在各广泛开展。养殖基地亲本多来自野生种群,养殖业的蓬勃发展,可能会影响到野生种群遗传结构。湖北省十堰市房县建有驯养规模在万尾以上的中国大鲵养殖基地,为建立亲本群体,当地野生种群可能经历过一次瓶颈效应,造成遗传多样性水平较低。而在同样建有大规模养殖基地的陕西省汉中,中国大鲵遗传多样性仍然维持在较高水平,这可能与当

地野生种群遗传多样性自身水平较高有关。

3.2 遗传结构及种群分化

中国三大水系的发育形成具有上亿年的历史, 其中长江与“黄河”分隔较早, 在中生代侏罗纪末至白垩纪初, 秦岭山脉的上升, 切断长江与北方的联系, 经历燕山运动后期后, 长江全貌显现^[22]。长江与珠江的分离是在白垩纪末、第三纪初燕山运动之南岭期时成形^[23]。黄河的形成时期最晚, 在新生代第四纪, 由于喜马拉雅运动, 西部青藏高原地势升高, 原有的湖泊相连而成。尽管黄河形成比较晚, 但早期已经出现大量湖泊溪流^[24]。迁徙力较差的古老物种在经历地理分隔事件后, 物种群体间基因流被阻断, 随着时间的积累而产生种内差异, 地理格局往往可以反映其遗传关系。本研究中国大鲵种群的聚类情况大致依照所属流域进行, 体现了与地理分布格局的统一性。种群聚类分析显示中国大鲵依照长江流域和黄河流域分为两大支。其中长江流域中属于长江中游段重要支流汉江水系的陕西和湖北两个种群聚类, 属于长江上游段的四川种群和贵州种群聚类。然而来自线粒体与同工酶方法的结果却未得到聚类与流域一致^[6-8]。Murphy 等^[6]采用线粒体与同工酶技术分析中国大鲵遗传多样性所用样品量为 18 尾, 陶峰勇等^[7-8]利用 Cyt b 和控制区序列分析时分别用到 13 尾和 28 尾。而本研究样品量达到 60 尾。样品量多少可能会影响到种群间遗传距离与聚类分析。此外, 分析方法的差异可能会影响到结果, 同工酶方法检测的多态位点数目有限, 相比而言 AFLP 标记可获得丰富的多态位点。

AFLP 分析得到的遗传分化指数 Φ_{st} 仅为 0.021, 显示分化较低。种群间 AMOVA 遗传变异分析也显示, 在众多变异中有 97.94% 存在于种群内, 仅有 2.06% 变异存在于种群间。遗传距离结果也显示中国大鲵不同地理种群间遗传差异较小。中国大鲵自身迁徙力很差, 除在自身流域内活动外, 在各流域之间迁徙较难, 那么为什么中国大鲵种群间的遗传分化如此小呢? 分析中国大鲵的使用历史, 可以得出人为操作是主要诱因。对中国大鲵食用与药用价值的认识最早始于战国时期, 距今有近 2 300 a 历史, 在相互交流中可能有中国大鲵的移动发生。但由于古代交通闭塞, 这种人为影响作用相对较弱。在 20 世纪 50 年代到 80 年代, 人们对中国大鲵进行了大规模捕杀贩卖, 其中存在个别个体在非原产地逃逸的现象; 另外, 对于被查获而没收的中国大鲵活体, 国家相关管理部门通常采用

就近放流, 此操作直接将其它地理种群引入当地野生群体, 造成极强的基因流效应。此外, 人工放流也是降低种群分化的一个重要原因。人工养殖鲵苗的亲本往往来自于全国各主要产区的野生个体, 放流操作一方面使得野外群体数量短期得到大量增加, 另一方面也严重破坏了当地原有种群的遗传结构。在 2002-2009 年期间, 中国大鲵各原产地先后组织了多次大规模的人工放流。

依据种群间遗传距离构建的 UPGMA 树得出位于中国北部的黄河流域群体处于树的基部, 显示北部群体具有较为古老的进化地位。其次分出的是位于中部的湖北、陕西种群, 最后为南部贵州及四川种群。提示中国大鲵北部种群更为原始, 其次为中部和南部种群。基于此推测, 中国大鲵首先到达中国北部, 并由此进一步向中部及南部地区进行扩散(图 4), 即由河南→陕西、湖北→四川、贵州。这一推测得到了化石证据的进一步支持。最早的现生蝶螈类化石发现于中国内蒙古及河北地区, 地质年代为侏罗纪中期, 其骨骼结构以及形态发育与隐鳃鲵科相似性极高^[25-26]。黄河流域是离中国内蒙古及河北地区最近的区域, 因而应该是中国大鲵最先到达的地域, 进而由此扩散到中南部地区。

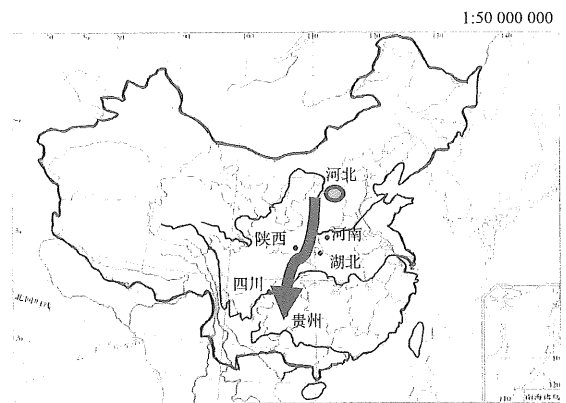


图 4 推测中国大鲵扩散途径示意图

Fig. 4 The sketch map of the deduced dispersal path of Chinese giant salamander

中国大陆黑斑侧褶蛙的扩散途径与本研究得出的中国大鲵的扩散途径一致, 即由北向南进行扩散^[27], 而杨玉慧等对中国黑斑蛙分析得出了由南至北的扩散方式^[28]。历史上冰期与间冰期轮回引起的气候波动及生境变化会影响到物种分布与扩散。第四纪冰期对北美洲和欧洲影响较大, 当地冰期后物种普遍呈现由南向北的扩散模式^[29-30]。东亚由于受到青藏高原隆起及季风气候的影响, 冰川

发育程度和面积要比北美与欧洲弱。在冰期影响不严重的地域,不同物种由于自身生境条件、繁殖能力与扩散能力的不同,其扩散途径可能存在差异。

参考文献:

- [1] AMATO M L, BROOKS R J, FU J. A phylogeographic analysis of populations of the wood turtle (*Glyptemys insculpta*) throughout its range [J]. *Mol Ecol*, 2008, 17: 570 - 581.
- [2] RISSLER L J, HIJMANS R J, GRAHAM C H, et al. Phylogeographic lineages and species comparisons in conservation analyses: a case study of California herpetofauna [J]. *Am Nat*, 2006, 167: 655 - 666.
- [3] GIBBS J P. Genetic structure of redback salamander *Plethodon cinereus* populations in continuous and fragmented forests [J]. *Biol Conserv*, 1998, 86: 77 - 81.
- [4] CURTIS J M R, TAYLOR E B. The genetic structure of coastal giant salamanders (*Dicamptodon tenebrosus*) in a managed forest [J]. *Biol Conserv*, 2004, 115: 45 - 54.
- [5] 叶昌媛, 费梁, 胡淑琴. 中国珍稀及经济两栖动物 [M]. 成都: 四川科学技术出版社, 1993: 64 - 69.
- [6] MURPHY R W, FU J Z, UPTON D E, et al. Genetic variability among endangered Chinese giant salamander, *Andrias davidianus* [J]. *Mol Ecol*, 2000, 9: 1539 - 1547.
- [7] 陶峰勇, 王小明, 郑合勋, 等. 中国大鲵四群体的遗传结构和地理分化 [J]. *动物学研究*, 2005, 26: 162 - 167.
- [8] 陶峰勇, 王小明, 郑合勋. 中国大鲵五地理群体 Cyt b 基因全序列及其遗传关系分析 [J]. *水生生物学报*, 2006, 30(5): 625 - 627.
- [9] 陈省平, 胡晓丽, 刘涛. 赤点石斑鱼 7 个地理群体的 AFLP 分析 [J]. *中山大学学报: 自然科学版*, 2009, 48(1): 56 - 61.
- [10] 王峥峰, 张军丽. 厚壳桂种群在不同群落中的 AFLP 分析 [J]. *中山大学学报: 自然科学版*, 2000, 39(4): 125 - 127.
- [11] RIBERON A, MIAUD C, GUYETANT R, et al. Genetic variation in an endemic salamander, *Salamandra atra*, using amplified fragment length polymorphism [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2004, 31: 910 - 914.
- [12] MATSUI M, TOMINAGA A. A survey by AFLP of genetic diversity in the Japanese giant salamander aiming conservation of local populations [J]. *Ecol Civil Eng*, 2007, 10(2): 175 - 184.
- [13] RUDH A, ROGELL B, HÖGLUND J. Non-gradual variation in colour morphs of the strawberry poison frog *Dendrobates pumilio*: genetic and geographical isolation suggest a role for selection in maintaining polymorphism. *Mol Ecol*, 2007, 16(20): 4284 - 4294.
- [14] VOS P, HOGERS R, BLEEKER M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting [J]. *Nucleic Acids Res*, 1995, 23: 4407 - 4414.
- [15] 章克家, 王小明, 吴巍, 等. 大鲵保护生物学及其研究进展 [J]. *生物多样性*, 2002, 10(3): 291 - 297.
- [16] 胡佳磊, 邵雪玲, 刘思阳. RAPD 引物数量对施式巴鲵遗传多样性评估结果的影响 [J]. *氨基酸和生物资源*, 2005, 27(1): 27 - 31.
- [17] NEVO E, BEILES A. Genetic diversity and ecological heterogeneity in amphibian evolution [J]. *Copeia*, 1991, 3: 565 - 592.
- [18] SOUZA F L, CUNHA A F, OLIVERIRA M A, et al. Partitioning of molecular variation at local spatial scales in the vulnerable neotropical freshwater turtle, *Hydromedusa maximiliani* (Testudines, Chelidae): implications for the conservation of aquatic organisms in natural hierarchical systems [J]. *Biol Conserv*, 2002, 104: 119 - 126.
- [19] PRIOR K A, GIBBS H L, WEATHERHEAD. Population genetic structure in the black rat snake; implication for management [J]. *Conserv Biol*, 1997, 11(5): 1147 - 1158.
- [20] WANG Y Q, ZHU W Q, HUANG L, et al. Genetic diversity of Chinese alligator (*Alligator sinensis*) revealed by AFLP analysis: an implication on the management of captive conservation [J]. *Biodivers Conserv*, 2006, 15: 2945 - 2955.
- [21] HAMRICK J L. Isozymes and the analysis of genetic structure in plant populations [M]. In: Soltis DE, Soltis PM (eds). *Isozymes in plant biology*. London: Chapman and Hall, 1990, 87 - 105.
- [22] 李承三. 长江发育史 [J]. *人民长江*, 1956(12): 3 - 6.
- [23] 翁文灏. 中国东部中生代以来之地壳运动及火山活动 [J]. *中国地质学会志*, 1927, 6(1): 9 - 36.
- [24] 戴英生. 黄河的形成与发育简史 [J]. *人民黄河*, 1983, 6: 2 - 7.
- [25] GAO K Q, SHUBIN N H. Late Jurassic salamanders from northern China [J]. *Nature*, 2001, 410: 574 - 576.
- [26] GAO K Q, SHUBIN N H. Earliest known crown-group salamanders [J]. *Nature*, 2003, 422: 424 - 428.
- [27] 张雄飞, 周开亚, 常青. 中国大陆黑斑侧褶蛙基 mtDNA 控制区序列的种群遗传结构 [J]. *遗传学报*, 2004, 31(11): 1232 - 1240.
- [28] 杨玉慧, 张德兴, 李义明, 等. 中国黑斑蛙种群的线粒体 DNA 多样性和生物地理演化过程的初探 [J]. *动物学报*, 2004, 50(2): 193 - 201.
- [29] HEWITT G M. Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation [J]. *Biol J Linn Soc*, 1996, 58: 247 - 276.
- [30] HEWITT G M. The genetic legacy of the quaternary ice ages [J]. *Nature*, 2000, 405: 907 - 913.