

Molecular Variation and Ecological Problems

分子变异与生态学问题

原作: T. Burke, W. Reiney 和 T. J. White

目 录

1. 引言	(181)
2. 技术与术语	(182)
2.1 材料来源	(182)
2.2 DAN—DNA 杂交	(182)
2.3 限制性片段分析	(182)
2.4 DNA 指纹分析	(182)
2.5 DNA 放大	(183)
2.6 DNA 测序	(183)
2.7 变性梯度凝胶电泳	(184)
2.8 随机放大多态性 DNA	(184)
3. 生态学应用	(184)
3.1 性别鉴定	(184)
3.2 交配制度	(185)
3.3 种群结构	(186)
3.4 迁移和基因流	(186)
3.5 渐渗现象与杂交地带	(187)
3.6 物种的鉴定	(187)
3.7 系统学	(188)
3.8 群落多样性	(188)
4. 结论	(188)

分子变异与生态学问题

1 引言

分子遗传学的新进展为生态学提供了许多新的并且具有很高的价值的技术。就象这些技术似乎是解决生态遗传学和进化生态学问题的基础一样，它们也开始为其他生态学领域提供了有用的研究工具。现在有一种倾向，批评许多生态学家喜好和应用这些新技术是一种潮流，或可能是生态学中的最新“时尚”(Abrahamson 等 1989)，但我们认为这是生态学家们的积极响应，因为这种新的可能性实际上会引发一次关键性的技术飞跃。

这些技术直接的重要作用是有用地检测生物个体间的差别 DNA。组成所有 DNA 分子的四种核苷酸的显然很简单的线性排列与表现在以下几个方面巨大而复杂的异质性是很不相符合的，这些方面包括进化速率、差异很大的序列结构、突变速率、固定速率以及选择压力等(图 1)。许多生物体的一

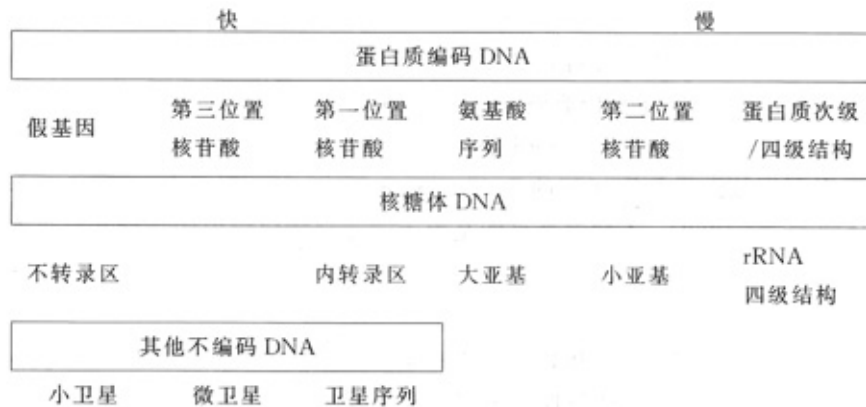


图 1 DNA 序列进化的相对速率

些基因组具有不同的遗传方式和序列进化率(见图 2)，对于它们的比较可以得到有价值的认识。另外，可用的各种分子技术本身提供了不同的敏感程度。这样就使从近缘的各种个体到在古代就已趋异的物种之间的每一种亲缘关系程度，最近已可能在目标 DNA 分级与适合作定量遗传差异(或相似)的分子方法间选择到一种结合。



图 2 不同类群中可用作分析的基因组

长期以来,对表型变异与保持感兴趣的生态学家们,通过分离等位变异涉及表型的基因,能够直接分离和研究其遗传构成。这将与在商业上具有重要价值的动、植物物种早已开展分子遗传研究一样,是一种自然的进步。

在这个综述中,我们主要集中于 DNA 变异的分析,而不是特异序列功能或特定位点选择过程的研究。我们通过有关生态学问题的实例来阐明其应用的范围。附表中,我们总结了迄今为止运用各种分子方法解决的生态学问题。我们顺序介绍其应用领域,并努力强调在每个领域中,现在看来最合适的方法。

由于大多数的技术可用于处理种种问题,为避免重复,首先我们来简单描述一下主要的新技术。

2 技术与术语

这一节论述了所用到的不同技术的一个概貌。与生态学家的需要特别有关的两本手册分别是由 Heolzel(1992)和 Hillis 与 Moritz(1990)编著的。本章所描述的已建立的主要方法在上述两本书上有详细的叙述和操作程序；其它的文献在需要的地方给出。

2.1 材料来源

实际上，任何细胞组织都是合适的 DNA 来源。在脊椎动物研究中，因为血液的获得是非破坏性的，所以是最常用的材料。DNA 所需的量依所用的技术的不同而不同。例如，对于以 DNA-DNA 杂交为基础的方法，如多位点 DNA 指纹，每次样品操作需要 5ugDNA(一般这个量足够以进行若干次操作)。材料从鸟类的血液(它的红细胞是具核的)中获得只需 1-2ul，对于哺乳动物来讲，只有白细胞具核，则需要 1ml 血液。对于应用扩增技术的方法来讲，如聚合酶链式反应(PCR)，虽然由于存在潜在的污染问题，通常都避免这么小的取样，但是在理想条件下，开始于一单倍体基因组(haploid genome)的分析是可行的。

尽管多数实验室一直都是采用冷冻的方法保存用于提取 DNA 的组织，但已经证明各种化学混合剂(包括促溶剂，螯合剂，乙醇和浓盐溶液)能够在环境温度下保存适用于大多数分析方法的相对较长的 DNA 分子至少几周或数月(见 Bruford 等, 1992)。例如，从酒精中保存 6 年之久的动物组织中提取出大量可被限制性核酸内切酶切断的 DNA(Smith 等 1987)。但是另外的研究则报道了低的产量和快速降解(Seutin 等, 1990)。不同之处可能是由于商业酒精的污染(Ito, 1992)。

2.2 DNA-DNA 杂交

杂交方法被用来(i)估计两个种基因组间总的相似性或(ii)在克隆之前，检测一个特殊的序列。它的简单方法是点樱(dot blot)，即在与标记了的探针杂交前，将等分试样的 DNA(甚至血液)点到滤膜上并固定。探针最常用的是放射性标记了的，但是非放射性标记的方法逐渐发展并普遍起来。通过各种合适的对照来比较其杂交强度可以测定目标样品中探针序列的存在。杂交的检测可以通过 X 射线放射自显影或直接在膜上探针的化学染色。当研究一特异性序列时，探针可以是一克隆了的 DNA 片段或一非常短的，典型的是 20-30 个碱基对，人工合成的寡核苷酸序列。一旦一个克隆被测序后，就可以设计寡核苷酸探针，并且原则上允许相对快速而方便地对序列变异数据的收集(如 Gardes 等 1991)。

2.3 限制性片段分析

用点樱法简单地检测相似序列经常是不够的，我们需要更详细的有关杂交的目标 DNA 的信息。直到最近，估测 DNA 序列变异的最简单方法是应用限制性片段(或限制性片段长度多态性, RFLP)来分析。首先，样品 DNA 被许多合用的限制性内切酶之一切成一定的片段，然后依它们的长度将这些片段通过电泳分离。限制性片段可以通过电泳凝胶片的染色观察或如上所述，按 Southern 樱法永久地转移到一个滤膜上经过杂交检测。(现在有些方法为了避免樱这一步，而是把片段在凝胶上干燥后直接杂交凝胶，如 Schafer 等 1988)。DNA 片段的存与在否暗示着应用特定限制性内切酶来识别的特异性目标序列的变异。

2.4 DNA 指纹分析

有两种不同级别的 DNA 指纹分析——多位点和单位点指纹。对于后者，通过与一克隆的小卫星探针的 Southern 樱杂交，可以检测在一个单位点上等位 DNA 限制性片段的不同大小(Wong 等 1987)。一个典型的小卫星 DNA 序列的长度大于 20,000 个碱基对，它包括一个短的 10-60 碱基对的非编码序列的重复拷贝。重复的次数有显著的差异，可以产生易于检测的不同长度的限制性片段，从而在一些小卫星位点得到了很

高水平的多态性(杂合率达 100%)。小卫星位点是“可变数量的串联重复(VNTR)”位点的例子。

在多位点 DNA 指纹法中, 用到了一个“多核心(poly-core)”探针, 它可与部分重复单位(即“核心”)自动杂交, 这种重复单位在微卫星的很多分离的位点上是很普通的(Jeffrey 等, 1985a, b)。可以用不同的核心探针来检测非依赖性小卫星带谱(independent minisatellite profiles)。多位点指纹法的一个主要优点是核心探针可用在广泛的生物体中(如 Burke 和 Bruford 1987, Dallas 1988, Taggart 和 Ferguson 1990, Carvalho 等 1991; 见 Burke 等 1991a 综述)。有关多位点和单位点小卫星 DNA 指纹法的详细实验室操作程序见 Bruford 等(1992)的文章。

多位点指纹法的一个缺点是指纹谱复杂, 难以比较, 特别是在不同的凝胶上得到的谱。组成的 DNA 片段也不能归因于特异性位点。单位点指纹法通过允许基因型归因于常常是高度变异的位点避免了这些问题, 但它也有缺点, 就是在所研究的每一个物种中或至少在一个近缘种中都得找出一种标记系统(Hanotte 等, 1991a, b, 1992)。然而, 现在可以使用一种相对有效的分离这种位点的方法(Armour 等 1990, Hanotte 等 1991a, b; Bruford 等(1992)的操作程序)。

另外一种级别的 VNTR 位点包括了简单的序列, 或微卫星多态性(Tautz 1989)。微卫星(microsatellite)包含不同数量简单而短的串联重复, 如(GT)_n 或(CAC)_n。小卫星和微卫星的区别是随意的, 但实际的区别是微卫星总的长度小到允许应用 PCR 技术分析。所以微卫星的变异分析比小卫星容易得多(见 Rassmann 等 1991, Schlotterer 等(1991)的方法)。特异位点微卫星系统常在宽范围的近缘种中适用(Schlötterer 等, 1991), 在一定程度上比小卫星探针更有用。由于这里数据太少而不能在两个级别的两个位点进行典型变异的细致比较。高水平的多态性很可能在小卫星位点上得到, 但微卫星的变异似乎适合大量的应用。

2.4 DNA 放大

一个相对较新的方法应用于大多数 DNA 样品中——包括相当粗提的总 DNA——这个方法是聚合酶链式反应(PCR)(Mullis 和 Faloona, Saiki 等 1988)。这种技术可以产生足量的确定长度的 DNA, 适合各种方法的进一步分析, 如 RFLP、测序和与特异探针的杂交。在聚合酶链式反应中, 应用一耐高温的 DNA 聚合酶循环复制相反的两条 DNA 链上两个引物部位之间的序列, 这个反应需要两个合成的寡核苷酸引物的存在与 DNA 上的这些部位互补, 每循环一次, 产量成倍增加。这个过程的灵敏度使得它可以对极少量 DNA 进行分析, 例如这些 DNA 可来自单个精子细胞(Amheim 等 1990), 单根头发(Higuchi 等, 1988), 单个羽毛(Taberlet 和 Bouvet, 1991), 古代的骨骼(Hagelber, 1989)或博物馆中的标本(Thomas 等, 1989, 1990)。由于所研究的序列只需要很少的完整拷贝, 甚至固定的或包埋了的组织都适合来提取 DNA 作 PCR(Greer 等 1991), 所以, 很简单的野外样品保存和实验室提取的操作程序都会令人满意。

因为扩增的 PCR 产品有足够的量可供直接在电泳凝胶片上检测, 所以 PCR 为杂交方法提供了另一个很好的选择。例如可以检测引物部位间的序列长度变异或检测在一个引物部位本身的变异。PCR 产物可以用作点印迹 DNA-DNA 杂交时的靶材料, 也可用作限制性分析。它们和其它技术(下文)可以不需要广泛地测序就可以相对方便地收集有用的基于序列的标记数据。

2.6 DNA 测序

直到最近, 得到一个序列之前, 必须先从所研究的生物体中克隆一个序列。比如对整个基因的 DNA 多态性的研究, 需要分别地从每个个体克隆基因(如 Kreitman 1983)。一旦一特定位点至少在一个亲缘生物体中得到克隆并测得序列(由此可设计出寡核苷酸引物), PCR 的优点是通常可以绕过克隆这一步。对一些位点来说, 可以鉴定两侧的序列段(stretches of flanking sequence), 它们在一广阔范围的类群中是高度保守的, 允许设计“通用”的引物(Kocher 等 1989, Hillis 和 Dixon 1991, Taberlet 等 1991)。现在已经有了直接对 PCR 产物测序的很好的操作程序(如 Winship 1989, Innis 等 1990, Lee 1991)。一些工作者喜欢在测序前亚克隆 PCR 产物, 但是这就意味着, 特别是当多序列需要排除人工核苷酸替换的可能时, 可能造成相当大的额外工作量。

2.7 变性梯度凝胶电泳

即便通过 PCR 和直接测序可以相对比较容易地获得序列数据,但是要积累起适合作核基因等位基因或线粒体单膜类型(haplotypes)比较的种群频率数据,是一个令人胆怯的任务。虽然除医学遗传学外,变性梯度凝胶电泳(DGGE)尚未被广泛应用,DGGE及其相近的方法(如温度梯度凝胶电泳(TGGE)(Riesner等1989)和PCR-单链构象多态性(SSCP)分析(Hayashi 1991))能够提供用来测序数十个样品的较低劳动强度的方法。Lessa(1992)和Myers等(1989)提供了DGGE方法详细的指导,但是,简单地说,这种方法需要为所研究的具有长G-C尾的区域准备一个引物。这种具有抗变性的G-C键的扩增产物可在含有脲的梯度凝胶上电泳。不同序列的产物在不同的脲浓度上部分地变性,对长度小于500bp的产物,小到只有1个碱基对替换的变化能够通过移动距离的不同而分辨出来。频率数据(包括杂合子的辨别)可直接由凝胶上得到。如果有要求的话,代表已检测了迁移等级的谱带上的样品可以被再放大并测序。在这种应用中,DGGE对研究DNA片段在种群内或其它研究单位内的中等变异是最有用的(就是说,不是所有的个体都是独特的)。然而,这对从种群遗传或系统发育角度作初步探索可能有同等的价值,即在被选择的各种个体的DNA片段测序前,在种群或分类群内或之间去评估最初放大的DNA片段是否有一定程度的变异。

2.8 随机放大多态性DNA

人们现在广泛地探索随机放大多态性DNA(RAPD),部分是由于它显著的简单性。它依赖于被研究的生物体中提取的DNA(有时来自分离的细胞器中),应用几组短的单链随机序列引物来测定变异(Williams等1990;Hardrys等1992)。经过琼脂糖电泳和溴化乙锭染色后,比较放大产物时,一些引物将产生少许分离的带,它们的一部分在种群内或种群间是多态的。当检测时,这些标记通常呈现显著的孟德尔遗传特性(Williams等1990,Arnold等1991)。在动植物中,这些标记可用来制作基因连锁图(Williams等1990)。

假设不了解被放大的区域,并且有关的书面出版物很少,对于每一种新的生物必须检验从不同个体中多次分别提取和放大(若有可能也包括遗传力)的产物模式的重复能力。应用得好,这种方法仅需要DNA分离、放大和琼脂糖凝胶电泳过程,就可提供丰富的多态性标记数据。避免了限制性酶和放射性标记的高消耗和复杂性。

3 生态学应用

在这一部分,我们讨论生态学家感兴趣的领域。所研究不同范畴的问题及用到的方法的实例列在附表。我们试着尽可能地选择与生态学家有关系的实例并尽可能包括有代表性的分类群。在很多情况下,虽然一个新而有前途的技术建立了,但仍没有正式发表的应用实例,反映了这一领域中技术发展的步伐还不快。阅读附表时,应注意这种可能性。就象在附表中所列的一样,读者必须明白所选的一些实例并不代表最有效的方法。

3.1 性别鉴定

Fisher(1930)预言,在有性的物种中,一种亲本应该在它的每一性别的后代中有均等的总投入。Trivers和Willard(1973)争辩说,当亲本的投入影响到一个后代以后的生殖成功(reproductive success)并且在生殖成功中某一性别的变异较大时,那么一种亲本应该在这种性别有较大的投入。对于许多通常的生物体研究对象来说,由于难于在幼年期作性别鉴定(sexing juveniles),因此这些粗放的试验、相关的假设以及一般性的生活史的研究受到了障碍。有一个在形态上可区别性别的例子,东部蓝色鸣鸟(*Sialia sialis*)的雄性亲本在它们的雌性后代中有较多的投入(Gowaty和Drage 1991)。有人认为,这个物种从出生到繁殖扩散之所以很低是因为嗜杀父(Philopatric)的雄性鸟可以为了雌性而要与它的亲生父亲竞争,所以雌性后代将占雄性适合度较大的比例。

性别是由遗传决定的关键是至少在一种性别的本身具某些特异性 DNA。原则上这种情况只需一个位点的等位基因的差异,而实际上差异一般广泛得多,常常包括了具性别特异的染色体。在这些情况下细胞学的性别鉴定是可行的,但通常要求作大样品是不切实际的(见 Parker 等 1991)。用分子标记去鉴别特殊的性染色体的序列特征,已有了一些实例。例如,Griffiths 和 Holland(1990)使用一种减法克隆(subtraction cloning)技术分离了食鲱鱼鸥(Larus argentatus)的 W 染色体(雌性特异的)的特异性探针。遗憾的是,就象其它类似的探针一样,这个探针只对很少一些近缘种有应用价值。也偶尔地发现了其它一些物种的伴性探针(如 Quinn 等 1990, Rabenold 等, 1991)。

长期以来,鉴定和分析性别决定基因本身似乎避免了这个问题。最近分离了在 Y-染色体上的性别决定区(SRY)的基因,并认为它对人类来说是性别决定位点(Sinclair 等 1990, Gubbay 等 1990)。它能够作为一个探针用印迹分析来确定一系列哺乳动物的性别(Sinclair 等 1990)。虽然在其它脊椎动物分类群中,它好象可能具有一个相同功能的同源物,但首次在鸟类寻找这样一个同源基因并不成功(Griffiths 1991)。一旦得到了合适的序列数据,至少就可以设计和合成在大范围的哺乳动物物种中有用的寡核苷酸探针,或至少可以设计寡核苷酸引物应用于 PCR。

3.2 交配制度

进化生态学家对交配制度特别感兴趣,他们希望能够度量个体在自然条件下的生殖成功情况。或者,也需要测量互助个体间的亲缘关系。在实践中,父本和母本的检验是测量亲缘关系的一种特殊情况(如 Birkhead 等 1990)。为这个目的,应用分子方法——特别是多位点 DNA 指纹和随机 RFLP 分析——进行研究,可见 Burke(1989)的综述。最近,单位点指纹分析发展迅速,现在已成为可选用的方法(Burke 等 1991b)。

多位点分析已应用于一些完全在野外进行的繁殖系统研究上,现在几乎已经成为常规方法。迄今多数研究集中在鸟类上,反映了鸟类作为行为生态学研究对象的普遍性,并且涉及到基本上是单配制度中确定是父性或是母性(见 Burke 等 1991b, Birkhead 和 Moller 1992)或者关注互助繁殖群成员之间的血统分布以及亲缘关系的程度(Burke 等 1989, Rabenold 等 1990, Jones 等 1991, Pacher 等 1991, Davies 等 1992)。

第一类研究范畴是关于交替交配对策(alternative mating strategies)的发生,例如,用排除分析(exclusion analyses)发现子代基因型与它们的推断亲本不一致,以此来检测额外配对(extra-pair)交配或种内繁殖寄生现象(brood parasitism)。例如,在鸟类饲养场对斑纹鸣鸟(Taeniopygia guttata)的交配行为的研究导致期望额外配对的父本可以在自然种群中出现。在对一野外种群指纹的推断研究中,由行为指定(behaviourally-assigned)的双亲本是完全的,并且经过排除分析,确认额外配对的父本以较低的频率发生(82 个后代中有 2 个),而种内繁殖寄生现象则意外地较显著(80 个后代中有 9 个)(Birkhead 等 1990)。

例如,在一个目的是为说明家系的研究中,绝大多数岩鸲(*Prunella modularis*)一般为多雄受精繁殖,2 个或更多的雄性共同拥有一个雌性。这些雄性一般互相没有亲缘关系,但有一种显性的关系,可能其中一个或两个雄性一起去帮助雌性喂养雏鸟。虽然这些雄性对它们的后代没有明显的偏爱,但应用多位点指纹的分析表明如果它们存在某些家系关系,它们就会倾向于喂养同窝的雏鸟(Burke 等 1987)。如果观察到一只雄鸟在雌鸟已受精还未产卵前一段时期内排外性地去接近雌性,那么它就更倾向于帮助喂养,而且由雄性喂养的程度与排外性地接近雌鸟的程度显著相关。指纹分析的数据表明,用观察接近的途径是一个好的家系指示,所以这就意味着雄性岩鸲就是用它们接近雌鸟的程度来决定是否喂养雏鸟。随后在一系列的去除(removal)实验中,通过人工操作使雄性个体交配成功(通过 DNA 指纹来确认),以上观点被实验所证实(Davis 等 1992)。

就象在岩鸲的研究中的情况一样,在只有少数的雄性候选者的情况下,应用多位点指纹分析能有效地指示家系,但是这经常需要对许多潜在的双亲作检验。在这种情况下,应用一个单位点指纹分析的系统是更有效的,它能在一系列高度多态位点上指示个体的基因型。Gibbs 等(1990)将多位点和单位点指纹分析结合起来,鉴别了 28%第 3 代红翅鸟鹀幼鸟的几乎所有父本,这些幼鸟不是由拥有它们出生地的雄性所生

的。这就说明了在一个雄性的领地上产生的后代数和它的实际生殖成功之间没有显著的相关,而且在它们自己领地上生育较大比例后代的这些雄性也进行了较多的额外交配的受精。Gibbs 及其合作者所用的单位点探针是一个鼠的组织相容性(histocompatibility)位点 cDNA, 它的用途是通过与一包含限制性片段的小卫星的偶然杂交而发现的;但是没有发现它普遍能用于其它的鸟类(Gibbs, 私人通信)。分别获得高多态性的小卫星或微卫星位点的特异性探针或引物的一般性的方法都是可行的(见前文), 而且这样一些位点结合使得多位点指纹法变得过时(Wong 等 1987, Hanotte 等 1991a)。其它的分子方法偶而也用到。Quinn 及其合作者们发现由雪雁中随机克隆的一系列 RFLP 有可观的变异, 并且可用来进行这个种的家系分析(Quinn 和 White, 1987, Quinn 等 1987)。Williams 和 Strobeck(1986)确认了果蝇 Y 染色体的核糖体基因的特异性 RFLPs, 由此我们能够揭示在野外种群中雌性果蝇发生过多次交配。本领域更详细的论述已超出本文的范围, 读者可参考一些已发表的综述(Burke 1989, Burke 等 1991b 和 Burke 等 1991a 中的其它论文)。

3.3 种群结构

种群结构是广义的话题, 包括从社群(social groups) 内到种群间在各种水平上研究亲缘关系与遗传分化。在前面一节内, 我们单独讨论了近缘家族关系的分析。

除等位酶不属于本评述的范围外, 线粒体 DNA(mtDNA) 是用于许多种群分化研究的大分子(Avise 等综述 1987)。例如, 84 只座头鲸(humpback whale)的 mtDNA(由皮肤活体解剖得到)的 RFLP 分析证明, 在亚种群之间, 以及来自北大西洋和北太平洋的种群之间有明显的单模标本(haplotypes)的分离(Baker 等 1990)。单模标本的地理分布与先前报道的夏季取食地与冬季繁殖地之间的迁移模式有惊人的一致。研究者认为, 这种遗传分离反映了“迁移目的的母系习性(maternal traditions in migratory destination)”, 揭示了要考虑到行为模式在种群结构分析中的重要性。在植物中, 质粒 DNA 也提供了很多类似 mtDNA 同样的进展, 并已在少数的种群结构研究中得到应用(如 Goff 和 Coleman 1988)。

从总基因组文库中分离的随机克隆已在种群水平上用于 RFLP 的研究。McDonald 和 Martinez(1990)研究了从一块麦地得到的一种真菌病原体 *Mycosphaerella graminicola* 的种群结构。他们发现了高程度的遗传变异, 包括一片叶子上不同的侵蚀斑(lesions)之间。他们的研究强调了在确认从不同地理位置取得的少量样品是否代表种群水平的变异之前, 评估空间尺度变异的重要性。

也偶尔使用另外一些 DNA 标记类型, 如核糖体 DNA(如 Learn 和 Schaal 1987)。尽管一般认为小卫星进化太快而不能用于种群水平的分析, Gilbert 等(1990)发现在讨论南加利福尼亚的海峡岛(channel islands)上矮小狐(dwarf foxes)小的分离种群的系统发育, 以及分离种群间遗传变异的相关水平时, 指纹模式能提供有益的信息。在大部分分离的岛上, 他们发现在取样的狐之间没有指纹变异, 一个指纹模式甚至在自交的实验室小鼠群中也未发现过。多位点指纹在鉴别自然种群内无性系成员方面也可有重要价值(Nybom 和 Schaal 1990, Turner 等 1990, Carvalho 等 1991, Brookfield 1992)。

PCR 使得在种群研究中收集实际的 DNA 序列是可行的, 而且它也允许用收藏在博物馆中的标本作实验。Thomas 等(1990)利用这种有利条件, 发现 78 年间 3 个口恶(kangaroo rat)种群的种群结构没有明显的变化。

3.4 迁移和基因流

当然, 迁移是种群结构的一个重要成分, 所以, 同样的方法学上的各种途径是有用的。在这个前提下, 我们列举了一些实例来着重强调应用分子的方法有时可以推断迁移模式。

例如, 在现代人的地理起源这个有争议的问题上, 通过从多类人种和黑猩猩取样的 mtDNA 替代环区(displacement loop region)的序列比较, 确认了人类 mtDNA 进化树的非洲起源(Vigilant 等 1991; 例外见 Templeton 1992)。Hagelberg 等(1989)在研究人类的人口迁移时, 扩展了 PCR 的用途。证明了扩增 5450 年以上的人骨的 mtDNA 的可行性。在一系列研究上, 无疑地, 对在形态学上无症状的骨头片段作了鉴定。

将 RFLP 分析与等位酶相结合, mtDNA 也被用在遗传学上研究和确认蝶螈两个种之间的历史上描绘

的杂种地带(hybrid zone)的变迁 (Arntzen 和 Wallis 1991)。代替了有花纹的蝶螈 (*Triturus marmoratus*) 种群的有冠肉的蝶螈 (*T. cristatus*) 种群的特征是存在一种低的但可辨认的渐渗的 *marmoratus* 等位基因频率。

Culex pipiens 蚊通过非特异性过量的产生多种酯酶来抗有机磷酸酯杀虫剂。这些酯酶中有一个在 B 位点上用电泳可察觉到的扩增了的 B₂ 等位基因。来自非洲、亚洲和北美洲样品的 B₂ 酯酶结构基因序列的限制位点分析显示其高度的同源性。这就指出了 B₂ 等位基因是由单突变发展而来, 并通过对杀虫剂诱导选择的有利性, 在世界范围种群之间快速扩散。

3.5 渐渗现象与杂交地带

适用于种群结构分析的技术也适于特殊情况的杂交地带。分析沿着杂交地带的基因渐渗, mtDNA 特别有价值(Harrison 1989 综述)。核糖体 DNA 也应用于某种程度的研究中(如 Baker 等 1989)。

Arnold 等(1991)用一种选择叶绿体基因的 PCR 和 RAPD 来研究路易斯安那鸢尾杂交种的形成。物种专有的 RAPD 标记的地理分布支持这样一个假设: *Iris fulva* 和 *I. hexagona* 通过基因流导致了定位的和扩散的渐渗。一个扩增的叶绿体基因片段(携带在雌性细胞质中)的 RFLP 分析, 说明是由于传粉而不是种子散布导致了基因流。

这个领域提供了某些成功应用 DGGE 的首例。Lessa(1992)应用 DGGE 研究了一种地鼠的杂交地带。

为了了解在形态上还识别不了有杂种存在的地区, 在有杂交潜势的白栎物种间基因交换的程度, Whittmore 和 Schaal(1991)观察了用来自矮牵牛叶绿体和大豆细胞核核糖体重复(ribosomal repeat)的克隆探针消化的基因组 DNA 限制片段印迹。他们发现, 虽然叶绿体基因型有某些大尺度的地理变异, 在同一地点一起生长的物种(包括常绿的和落叶的)却经常地具有相同的叶绿体基因型。一个种在不同的地点具有不同的叶绿体基因型, 而细胞核核糖体的标记则显示了一种分布格局与所期望的物种界线(boundaries)是一致的。他们在叶绿体核 DNA 中观察到的地理变异和明显的基因流的极明显的悬殊差别的格局, 强调了在依据由细胞器得来的数据解释种群或类群界线时要特别谨慎(Pamilo 和 Nei, 1988)。

3.6 物种的鉴定

总 DNA 的提取物间杂交的程度已被广泛地作为一种方法来估测物种间的亲缘关系。特别是在原核生物之间, 当一些生物具 90% 或以上的杂交值时, 这种方法就用来把它们粗略定为物种(Woese 1987)。然而, 这种方法的分辨率和分类学范围经常是低的, 需要作比较就要求有大量的 DNA。

物种特异性探针在研究宿主—媒介(vector)—寄生物系统中特别有用。Kukla 等(1987)使用包含有重复序列的放射活性标记的限制片段克隆, 鉴定了采采蝇组织中锥虫的种和亚种。他们发展了一种应用于野外的方法, 将分离的蝇腹部整个地放在尼龙膜上与标记的探针杂交, 就能确认和鉴定肠锥虫。通过筛选一个基因文库, Harnett 等(1989)发现并测定了一寡核苷酸探针的序列, 它能区别引起人类河盲症(river blindness)的一种线虫 *Onchocerca volvulus* 和形态上相似但不是病原体的另外一个 *Onchocerca* 种, 它们携带在同样的蚋(blackfly)媒介上。

Persing 等(1990)应用包柔氏螺旋体(*Borrelia*)特异性引物和 PCR 去研究博物馆鹿标本上蜱中的症状 DNA 片段, 表明 Lyme 疾病的临床发现至少 30 年前就已经在美国存在了。Lyme 病原体 *Borrelia burgdorferi* 另外一随机克隆的序列分析, 能够帮助设计 PCR 引物, 以此把北美类型与欧洲和亚洲隔离类型分辨开(Rosa 等 1991)。

Goff 等(1988)应用探针研究 *Anaplasma marginale* 表面蛋白基因, 检测了蜱与牛被传染的频率。由此可监测宿主携带状态、疾病传染方式和地方性兽病区蜱传染的流行。Rowan 和 Powers(1991)测定了由 22 个海洋动物宿主类群上取得的 131 个个体隔离群的单细胞藻类共生体的 rDNA 小亚基片段序列。系统发育上远缘的宿主上发现了近缘的藻类。这种折衷的和如此广的分布区对藻类共生体来说, 是一种结合的群聚模式, 这种模式与某些动物寄生物的分化历史有时同宿主一致的情况是十分不一样的(Page

1990)。

DNA 分析可以进行血液寄生节肢动物的寄主的分类。为更好地说明这种方法的潜力, Coulson 等 (1990) 应用单位点小卫星指纹分析蚊子的肠子内含物, 得到了被这种蚊叮过的人的基因型。

3.7 系统学

生态学家之所以对系统学感兴趣, 是考虑到去识别特殊的物种以及对物种间进化关系的理解。分子技术可广泛地应用于系统学的研究, 这个领域已广泛地评述过了 (Hillis 和 Moritz 1990, Hewitt 等 1991; 表中的实例)。实际上, 任何客观的、基于遗传的特性都具有可为分类学提供资料的意义, 不同方法的价值将按所研究的群体内遗传多样性的大小而不同。尽管由 DNA-DNA 杂交提供的表型性的方法成功地应用着 (特别是在鸟类中; Sibley 和 Ahlquist 1990); DNA 序列的系统发育分析被看好, 而且现在由于 PCR 的发明而使之变得更加可行。在这之前, 只有核糖体 RNA 基因能测序到值得注意的程度 (Woese 1987, Hillis 和 Dixon 1991)。

应用 PCR 的首次研究为测定 mtDNA 序列而研究了通用引物的特性 (Kocher 等 1989)。例如, Richman 和 Price (1992) 应用这样的引物, 从 8 个 *Phylloscopus* 鸣禽同地种, 得到了具有 910 个碱基对的线粒体细胞色素 b 序列, 建立了这些群体的系统发育。支持这些物种的形态学、取食行为和生态学适应解释的一个比较分析中, 系统发育被用来核实共同祖先的影响。

物种的分类与保护特别有关系, 这一点已被一系列 mtDNA 变异的研究结果所强调过, 在设想是分离的小地鼠 (Learn 等 1982) 和海滨麻雀 (Awise 和 Nelson 1989) 的物种或亚种间, 在可能是杂种起源的红狼 (Wayne 和 Jenks 1991) 以及被外源基因渐渗的濒危的美洲狮和灰狼种群 (见 O' Brien 和 Mayr 1991) 中, 都见不到有 mtDNA 明显的分化。通过使用 PCR 对红狼标本的分析, 排除了杂交是最近发生的可能性。分子系统学也用来揭示这样的事例——不同的分类群可被归并为一个种, 特别是在形态上保守的谱系中 (Daugherty 等 1990)。

3.8 群落多样性

多个 rDNA 小亚基序列的同时扩增提供了一个检测微生物自然多样性的有用方法。Giovannoni 等 (1990) 把从浮游细菌的自然种群得到的 16s rRNA 基因扩增部分的克隆测了序。经过培养, 增加了可检测的多样性, 一些以前未知的分类群既在系统发育上是分离的, 又是微生物群落中在数量上重要的成员。

Ward 等 (1990) 简单地检测了一陆地温泉中蓝藻细菌丛中微生物物种的组成。用一保守的寡核苷酸引物, 他们通过从环境样品中取得的 16s rRNA 合成了 DNA。经过克隆和测序, 并与来自相似生境培养的有机体的 16s rRNA 序列相比较后发现, 所检测的 8 个序列类型没有一个同这一地点以前已知的 14 种生物相一致。这清楚地表明, 分子工具可以揭示出微生物群落中从前未检测出的多样性, 而且新生物体的检测并不限于稀有类群。

4 结 论

DNA 水平变异的程度和类型, 特别是在物种内, 只是最近才为人所知。新技术特别是 PCR 的发明, 使得检测这类变异变得容易起来。一般来讲, 以 PCR 为基础的方法已经成为并且将来仍是我们所选择的研究方法。

出于对一些有利因素的考虑, mtDNA 已经成为在 DNA (限制片段) 水平上研究不同种群的通用信息源 (见 Hillis 和 Moritz 1990)。这延伸了由 PCR 获得序列数据的情况, 原因可能是由于 mtDNA 分子具有比核 DNA 序列更经常的核苷酸置换率; 对 mtDNA 一些区域的了解和高度不同的进化速率; “通用” 引物的可用性 (Kocher 等 1989) 以及线粒体基因组的单倍性。最后一点避免了在双倍体核基因组中潜在的问题, 也避免了测定单模标本的序列 (Kreitman 1991)。通常核标记也是可行的 (Pamilo 和 Nei 1988), 虽然在这里经常用到 “等位酶”, 而 DNA 标记在确定变异程度时能提供更大的灵活性。由于物种内典型的核苷酸多态性水平

是 1%或更小(Kreitman 1991),对生态学家来说,样品的大量序列分析一般不是最适合的方法。于是,我们转向更简捷的方法,例如,应用 DGGE,寡核苷酸探针,限制性酶切片段,或者对已测序的多态区中的 PCR 产物的简单的大小测度。

虽然这些技术变的易于掌握,但他们的成功应用仍需要很多的脑力劳动,而且生态学家要注意,不要陷入只把实验室工作看作简单技术活动的错误之中。最后,分子方法在生态学过程研究中的应用,将是由不辞辛劳,互相了解对方优缺点的科学家们将野外和实验室工作巧妙结合的结果。

参考文献

- Abrahamson, W.G., Whitham, T.G. & Price, P.W. (1989). Fads in ecology. *BioScience*, 39, 321-325.
- Armour, J.A.L., Povey, S., Jeremiah, S. & Jeffreys, A.J. (1990). Systematic cloning of human minisatellites from ordered array charomid libraries. *Genomics*, 8, 501-502.
- Arnheim, N., Li, H. & Cui, X. (1990). PCR analysis of DNA sequences in single cells: single sperm gene mapping and genetic disease diagnosis. *Genomics*, 8, 415-419.
- Arnold, M.L., Buckner, C.M. & Robinson, J.J. (1991). Pollen mediated introgression and hybrid speciation in Louisiana irises. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 88, 1398-1402.
- Arntzen, J.W. & Wallis, G.P. (1991). Restricted gene flow in a moving hybrid zone of the newts *Triturus cristatus* and *T. marmoratus* in western France. *Evolution*, 45, 805-826.
- Avise, J.C. & Nelson, W.S. (1989). Molecular relationships of the extinct dusky seaside sparrow. *Science*, 243, 646-648.
- Avise, J.C., Arnold, R.M., Ball, E., Bermingham, T., Lamb, G.E., Neigel, C.A., Reeb, C.A. & Saunders, N.C. (1987). Intraspecific phylogeography: the mitochondrial bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18, 489-522.
- Baker, C.S., Palumbi, S.R., Lambertsen, R.H., Weinrich, M.T., Calambokidis, J. & O'Brien, S.J. (1990). Influence of seasonal migration on geographical distribution of mitochondrial DNA haplotypes in humpback whales. *Nature*, 344, 238-240.
- Baker, R.J., Davis, S.K., Bradley, R.D., Hamilton, M.J. & Van Den Bussche, R.A. (1989). Ribosomal DNA, mitochondrial DNA, chromosomal, and allozymic studies on a contact zone in the pocket gopher, *Geomys*. *Evolution*, 43, 63-75.
- Balazs, I., Neuweiler, J., Gunn, P., Kidd, K.K., Kuhl, J. & Mingjun, L. (1992). Human population genetic studies using hypervariable loci. *Genetics*, 131, 191-198.
- Birkhead, T.R. & Moller, A.P. (1992). *Sperm Competition in Birds*. Academic Press, London, UK.
- Birkhead, T.R., Burke, T., Zann, R., Hunter, F.M. & Krupa, A.P. (1990). Extra pair paternity and intraspecific brood parasitism in wild zebra finches, *Taeniopygia guttata*, revealed by DNA fingerprinting. *Behavioural Ecology and Sociobiology*, 27, 315-324.
- Brookfield, J.F.Y. (1992). DNA fingerprinting in clonal organisms. *Molecular Ecology*, 1, 21-26.
- Bruford, M.W., Hanotte, O., Brookfield, J.F.Y. & Burke, T. (1992). Single locus and multilocus DNA fingerprinting. *Molecular Genetic Analysis of Populations: A Practical Approach* (Ed. by A.R. Hocelzel), pp. 225-269. IRL Press, Oxford, UK.
- Bruns, T.D., White, T.J. & Taylor, J.W. (1991). Fungal molecular systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 22, 525-564.
- Burke, T. (1989). DNA fingerprinting and other methods for the study of mating success. *Trends in Ecology and Evolution*, 4, 139-144.
- Burke, T. & Bruford, M.W. (1987). DNA fingerprinting in birds. *Nature*, 327, 149-152.
- Burke, T., Davies, N.B., Bruford, M.W. & Hatchwell, B.J. (1989). Parental care and mating behaviour of polyandrous dunlocks *Prunella modularis* related to paternity by DNA fingerprinting. *Nature*, 338, 249-251.
- Burke, T., Dolf, G., Jeffreys, A.J. & Wolff, R. (Eds) (1991a). *DNA Fingerprinting: Approaches and Applications*. Birkh[Aka]user, Basel, Switzerland.
- Burke, T., Hanotte, O., Bruford, M.W. & Cairns, E. (1991b). Multilocus and single locus minisatellite analysis in population biological studies. *DNA Fingerprinting: Approaches and Applications* (Ed. by T. Burke, G. Dolf, A.J. Jeffreys & R. Wolff), pp. 154-168.
- Birkh[Aka]user, Basel, Switzerland.
- Carvalho, G.R., Maclean, N., Wratten, S.D., Carter, R.E. & Thurston, J.P. (1991). Differentiation of aphid clones using DNA fingerprinting from individual aphids. *Proceedings of the Royal Society of London*, B243, 109-114.
- Coulson, R.M.R., Curtis, C.F., Ready, P.D., Hill, N. & Smith, D. (1990). Amplification and analysis of human DNA present in mosquito bloodmeals. *Medical and Veterinary Entomology*, 4, 357-366.
- Dallas, J.F. (1988). Detection of DNA fingerprints of cultivated rice by hybridization with a human minisatellite probe. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 85, 6831-6835.

- Daugherty, C.H., Cree, A., Hay, J. M. & Thompson, A. M. B.(1990) . Neglected taxonomy and continuing extinctions of tuatara(*Sphenodon*). *Nature*, 347,177-179.
- Davies ,N B., Hatachwell, B. J., Robson, T.& Burke, T. (1992). Paternity and parental effort in dunnocks *Prunella modularis*:how good are male chick feeding rules? *Animal Behaviour*, 43, 729-745
- Fisher, R. A. (1930). *The Genetical Theory of Natural Selection*. Clarendon Press, Oxford, UK. Gardes, M., White, T.J., Fortin, J.A., Bruns, T. D.& Taylor, J.W.(1991). Identification of indigenous and introduced symbiotic fungi in ectomycorrhizae by amplification of nuclear and mitochondrial ribosomal DNA. *Canadian Journal of Botany*, 69, 180-190.
- Gibbs, H.L., Weatherhead, P.J., Boag, P. T., White, B.N.,Tabak, L.M. & Hoysak, D. J. (1990) .Realized reproductive success of polygynous red winged blackbirds revealed by DNA markers. *Science*,250, 1394-1397
- Gilbert, D.A., Lehman, N., O' Brien, S.J. & Wayne, R. K. (1990). Genetic fingerprinting reflects population differentiation in the California Channel Island fox.*Nature*,344,764-767.
- Giovannoni,S.J.,Britschgi,T.B.,Moyer,C.L. & Field,K.G.(1990).Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Nature*, 345, 60-63
- Goff, L. J. & Coleman, A. W. (1988). The use of plastid DNA restriction endonuclease patterns in delineating red algal species and populations. *Journal of Phycology*, 24,357-368.
- Goff, W., Barbet, A., Stiller, D., Palmer, G., Knowles, D. , Kocan, K., Gorham,J. & Meguire, T. (1988) . Detection of *Anaplasma marginale* infected tick vectors by using a cloned DNA probe. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 85, 919-923
- Gowaty , P.A. & Droge, D.L.(1991). Sex ratio conflict and the evolution of sex biased provisioning in birds. *Acta XX Congressus Internationalis Ornithologici*, II,932-945
- Greer, C. E., Lund, J. K. & Manos, M. M. (1991).PCR amplification of paraffinembedded tissues: recommendations on fixatives for long term storage and prospective studies. *PCR Methods and Applications*, I, 46-50
- Griffiths, R. (1991) . The isolation of conserved DNA sequences related to the human sexdetermining region Y gene from the lesser black backed gull(*Larus fuscus*) . *Proceedings of the Royal Society of London, B*, 244,123-128
- Griffiths, R. & Holland, P.(1990). A novel avian W chromosome DNA repeat sequence in the lesser black backed gull(*Larus fuscus*). *Chromosoma*, 99, 243-250
- Gubbay, J. , Collignon, J., Koopman, P., Capel, B., Economou,A., Munsterberg, A. , Vivian, N., Goodfellow, P. & Lovell Badge, R> (1990). A gene mapping to the sexdetermining regions of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature*, 346, 245-250
- Hadrys, H., Ballick, M. & Schierwater, B. (1992) . Applications of random amplified polymorphic DNA in molecular ecology. *Molecular Ecology* , I, 55-63
- Hagelberg, E., Sykes, B. & Hedges, R. (1989). Ancient bone Dna amplified. *Nature*, 342-485
- Hanotte,O.,Burke,T.,Armour,J.A.L. & Jeffreys,A.J.(1991b).Cloning,characterization and evolution of Indian peafowl *Pavo cristatus* minisatellite loci.DNA Fingerprinting:Approaches and Applications (Ed.by T.Burke,G.Dolf,A.J.Jeffreys & R. Wolff),pp.193-216.Birkh[AKA "]user,Basel,Switzerland.
- Hanotte, O., Burke, T., Armour, J. A. L. & Jeffreys, A. J. (1991a). Hypervariable minisatellite DNA sequences in the Indian peafowl *Pavo cristatus*. *Genomics*, 9, 587-597.
- Hanotte, O. , Cairns, E., Robson, T., Double, M. & Burke, T. (1992) . Cross species hybridization of a single locus minisatellite probe in passerine birds. *Molecular Ecology*, I, 127-130.
- Harnett, W., Chambers, A. E., Renz, A. & Parkhouse, R. M. E. (1989). An oligonucleotide specific for *Onchocerca volvulus*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 28, 77-84.
- Harrison, R . G. (1989). Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. *Trends in Ecology and Evolution*, 4, 6-11.
- Hayashi, K.(1991) . PCR SSCP: A simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. *PCR Methods and Applications* , 1,34-38.
- Helm Bychowski, K. M. & Wilson, A. C. (1986) . Rates of nuclear DNA evolution in pheasant like birds: evidence from restriction maps. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*,83, 688-692.
- Hewitt, G. M., Johnston, A. W. B. & Young, J. P. W. (Eds) (1991) . *Molecular Techniques in Taxonomy*. Springer Verlag, Berlin, Germany. Higuchi, R., von Beroldingen, C.H., Sensabaugh, G. F. & Erlich, H. A. (1988). DNA typing from single hairs. *Nature*, 332, 543-546.
- Hillis, D. M . & Dixon, M. T. (1991) . Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Quarterly Review of Biology*, 66, 411-453.
- Hillis ,D.M. & Moritz, C. (Eds)(1990) . *Molecular Systematics*. Sinauer, Sunderland, MA, USA.
- Hoelzel, A. R. (Ed.) (1992) . *Molecular Genetic Analysis of Populations: A Practical Approach*. IRL Press, Oxford, UK. Innis, M. A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. & White, T.J.(Eds) (1990) .*PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, New York, NY, USA. Ito K.(1992). Nearly complete loss of nucleic acids by commercially available highly purified ethanol. *Biotechniques* 12, 69-70.

- Jeffreys, A.J., Wilson, V. & Thein, S.L. (1985a). Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature*, 314, 67-73.
- Jeffreys, A.J., Wilson, V. & Thein, S.L. (1985b). Individual specific 'fingerprints' of human DNA. *Nature*, 316, 76-79.
- Jones, C.S., Lessells, C.M. & Krebs, J.R. (1991). Helpers at the nest in European bee-eaters (*Merops apiaster*): a genetic analysis. *DNA Fingerprinting: Approaches and Applications* (Ed. by T. Burke, G. Dolf, A.J. Jeffreys & R. Wolff), pp. 169-192. Birkhäuser, Basel, Switzerland.
- Kocher, T.D., Thomas, W.K., Meyer, A., Edwards, S.V., P[AKa "][AKa "]bo, S., Villablanca, F.X. & Wilson, A. C. (1989). Dynamics of mitochondrial evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 86, 6196-6200.
- Kreitman, M. (1983). Nucleotide polymorphism at the alcohol dehydrogenase locus of *Drosophila melanogaster*. *Nature*, 304, 412-417.
- Kreitman, M. (1991). Variation at the DNA level: something for everyone. *Molecular Techniques in Taxonomy* (Ed. by G. M. Hewitt, A. W. B. Johnston & J. P. W. Young), pp. 15-32. Springer Verlag, Berlin, Germany.
- Kukla, B. A., Majiwa, P. A. O., Young, J.R., Moloo, S. K. & Muiyoi, O. (1987). Uses of species specific DNA probes for detection and identification of trypanosome infection in tsetse flies. *Parasitology*, 95, 1-16.
- Laerm, J., Avise, J. C., Patton, J. C. & Lansman, R.A. (1982). Genetic determination of the status of an endangered species of pocket gopher in Georgia. *Journal of Wildlife Management*, 46, 513-518.
- Learn, Jr. G. H. & Schaal, B. A. (1987). Population subdivision for ribosomal repeat variants in *Clematis fremontii*. *Evolution*, 41, 433-438.
- Lee, J. S. (1991). Alternative dideoxy sequencing of double stranded DNA by cyclic reactions using Taq polymerase. *DNA and Cell Biology*, 10, 67-73.
- Lessa, E. P. (1992). Analysis of DNA sequence variation at the population level by PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *Methods in Enzymology* (in press).
- Lucchini, G. M. & Altwegg, M. (1992). Ribosomal RNA gene restriction patterns as taxonomic tools for the genus *Aeromonas*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 42, 384-389.
- McDonald, B.A. & Martinez, J.P. (1990). DNA restriction fragment length polymorphisms among *Mycosphaerella graminicola* isolates collected from a single wheat field. *Phytopathology*, 80, 1368-1373.
- Moritz, C., Dowling, T. E. & Brown, W. M. (1987). Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18, 269-292.
- Mullis, K. B. & Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction. *Methods in Enzymology*, 55, 335-350.
- Myers, R. M., Sheffield, V. C. & Cox, D. R. (1989). Mutation detection by PCR, GC clamps and denaturing gradient gel electrophoresis. *PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification* (Ed. by H.A. Erlich), pp. 71-88. Stockton Press, New York, NY, USA.
- Nybom, H. & Schaal, B. A. (1990). DNA 'fingerprints' reveal genotypic distributions in natural populations of blackberries and raspberries (*Rubus*, Rosaceae). *American Journal of Botany*, 77, 883-888.
- O'Brien, S.J. & Mayr, E. (1991). Bureaucratic mischief: recognizing endangered species and subspecies. *Science*, 251, 1187-1188.
- Olson, R. R., Runstadler, J. A. & Kocher, T. D. (1991). Whose larvae? *Nature*, 351.
- Packer, C., Gilbert, D. A., Pusey, A. E. & O'Brien, S. J. (1991). A molecular genetic analysis of kinship and cooperation in African lions. *Nature*, 352, 562-565.
- Page, R. D. M. (1990). Temporal congruence and cladistic analysis of biogeography and cospeciation. *Systematic Zoology*, 39, 205-226.
- Palmer, J. D. (1987). Chloroplast DNA evolution and biosystematic uses of chloroplast DNA variation. *American Naturalist*, 140, S6-S29.
- Pamilo, P. & Nei, M. (1988). Relationships between gene trees and species trees. *Molecular Biology and Evolution*, 5, 568-583.
- Parker, J. S., Birkhead, T. R., Joshua, S.K., Taylor, S. & Clark, M.S. (1991). Sex ratio in a population of guillemots *Uria aalge* determined by chromosome analysis. *Ibis*, 133, 423-424.
- Persing, D.H., Telford, III S.R., Rys, P.N., Dodge, D.E., White, T.J., Malawista, S.E. & Spielman, A. (1990). Detection of *Borrelia burgdorferi* DNA in museum specimens of *Ixodes dammini* ticks. *Science*, 249, 1420-1423.
- Quinn, T.W. & White, B. N. (1987). Identification of restriction fragment length polymorphisms in genomic DNA of the lesser snow goose (*Anser caerulescens*). *Molecular Biology and Evolution*, 4, 126-143.
- Quinn, T.W., Cooke, F. & White, B.N. (1990). Molecular sexing of geese using a cloned Z chromosomal sequence with homology to the W chromosome. *Auk*, 107, 199-202.
- Quinn, T. W., Quinn, J.S., Cooke, F. & White, B. N. (1987). DNA marker analysis detects multiple maternity and paternity in single broods of the lesser snow goose (*Anser caerulescens*). *Nature*, 326, 392-394.
- Rabenold, P. P., Piper, W.H., Decker, M. D. & Minchella, D. J. (1991). Polymorphic minisatellite

amplified on avian W chromosome. *Genome*, 34, 489-493.

Rabenold, P.P., Rabenold, K.N., Piper, W.H., Haydock, J. & Zack, S. W. (1990). Shared paternity revealed by genetic analysis in cooperatively breeding tropical wrens. *Nature*, 348, 538-540.

Rassmann, K., Schl[AKu "]tterer, C. & Tautz, D.(1991). Isolation of simple sequence loci for use in polymerase chain reaction based DNA fingerprinting. *Electrophoresis*, 12, 113-118.

Raymond, M., Callaghan, A., Fort, P. & Pasteur, N. (1991) . Worldwide migration of amplified insecticide resistance genes in mosquitoes. *Nature*, 350, 151-153.

Richman, A.D. & Price, T. (1992) . Evolution of ecological differences in the Old World leaf warblers :roles of history and adaptation. *Nature*, 355, 817-821.

Riesner, D. , Steger, R., Zimmat, R., Owens, R. A., Wagenhofer, M. , Hillen, W. , Vollbach, S. & Henco, K. (1989) . Temperature gradient gel electrophoresis of nucleic acids: Analysis of conformational transitions, sequence variations and protein nucleic acid interactions. *Electrophoresis*, 10, 377-389.

Rogstad, S. H. Surveying plant genomes for VNTR loci. *Molecular Evolution: Producing the Biochemical Data* (Ed. by E.A. Zimmer, T.J. White, R.L. Cann, & A. C. Wilson). Academic Press, San Diego, CA, USA (in press).

Rosa, P.A., Hogan, D. & Schwan, T. G. (1991). Polymerase chain reaction analyses identify two distinct classes of *Borrelia burgdorferi*. *Journal of Clinical Microbiology*, 29, 524-532.

Rowan, R. & Powers, D. (1991) . A molecular genetic classification of zooxanthellae and the evolution of animal algal symbioses. *Science*, 251, 1348-1351.

Saiki, R. K., Gelfand, D. H. , Stoffel, S., Scharf, S. J. Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. & Erlich, H. A. (1988). Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239, 487-491.

Sch[AKa "]fer, R., Zischler, H., Birsner, U., Becker, A. & Epplen, J. T.(1988). Optimized oligonucleotide probes for DNA fingerprinting. *Electrophoresis*, 9, 369-374.

Schl[AKo "]tterer, C., Amos, B. & Tautz, D. (1991) . Conservation of polymorphic simple sequence data in cecean species. *Nature*, 354, 63-65.

Seutin, G., White, B. N. & Boag, P.T.(1990) . Preservation of avian blood and tissues for DNA analyses. *Canadian Journal of Zoology*. 69, 82-90.

Sibley, C. J. & Ahlquist, J. E. (1990) . *Phylogeny and Classification of Birds: A study in Molecular Evolution*. Yale University Press, New Haven, CT, USA.

Sinclair, A. H., Berta, P., Palmer, M. S., Hawkins, J. R., Griffiths, B., Smith, M.J., Foster, J. W., Frischauf, A. M., Lovell Badge, R., Goodfellow, P. N. (1990). A gene from the human sex determining regions encodes a protein with homology to a conserved DNA binding motif. *Nature*, 346, 240-244.

Smith, L. J. , Braylan, R.C., Nutkis, J. E., Edmundsen, K.B., Downing, J. R. & Wakeland, E. K. (1987). Extraction of cellular DNA from human cells and tissues fixed in ethanol. *Analytical Biochemistry*, 160, 135-138.

Soltis, P. S., Soltis, D. E. & Doyle, J. J. (1992) . *Plant Molecular Systematics*. Chapman & Hall, London, UK.

Taberlet, P. & Bouvet, J. (1991). A single plucked feather as a source of DNA for bird genetic studies. *Auk*, 108, 959-960.

Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G. & Bouvet, J. (1991) . Universal primers for amplification of three non coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology*, 17, 1105-1109. Taggart, J. B. & Ferguson, A. (1990). Minisatellite DNA fingerprints of salmonid fishes . *Animal Genetics*, 21, 377-389.

Tautz, D. (1989). Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research*, 17, 6463-6471. Templeton, A. R. (1992) . Human origins and analysis of mitochondrial DNA sequences. *Science*, 255,737.

Thomas, R. H. & Hunt, J. A. (1991). The molecular evolution of the alcohol dehydrogenase locus and the phylogeny of Hawaiian *Drosophila*. *Molecular Biology and Evolution*, 8, 687-702.

Thomas, R. H., Schaffner, W., Wilson, A. C. & p[AKa "] [AKa "]bo, S. V.(1989). DNA phylogeny of the extinct marsupial wolf. *Nature*, 340,465-467.

Thomas, W. K. , P[AKa "] [AKa "]bo, S. , Villablanca, F. X. & Wilson, A. C. (1990). Spatial and temporal continuity of kangaroo rat populations shown by sequencing mitochondrial DNA from museum specimens. *Journal of Molecular Evolution*, 31,101-112.

Trivers, R.L. & Willard, D.E.(1973). Natural selection of parental ability to vary the sex ratio of offspring. *Science*, 179,90-92.

Turner, B.J., Elder, J.F. Jr., Laughlin, T.F. & Davis, W.P.(1990) Genetic variation in clonal vertebrates detected by simple sequence DNA fingerprinting. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA*, 87, 5653-5657.

Vigilant, L. , Stoneking, M., Harpending, H., Hawkes, K. & Wilson, A. C. (1991) . African populations and the evolution of human mitochondrial DNA. *Science*, 253, 1503-1507.

Ward, D. M., Weller, R. & Bateson, M. M. (1990). 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganism in a natural community. *Nature*, 345, 63-65.

Wayne, R. k. & Jenks, S. M. (1991). Mitochondrial DNA analysis implying extensive hybridization of the endangered red wolf *Canis rufus*. *Nature*, 351, 565-568.

Welsh, J., Pretzman, C., Postic, D., Saint Girons, I., Baranton, G. & McClelland, M. (1992). Genomic fingerprinting by arbitrarily primed polymerase chain reaction resolves *Borrelia burgdorferi* into three distinct phylogenetic groups. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 42, 370-377.

Whittemore, A. T. & Schaal, B. A. (1991). Interspecific gene flow in sympatric oaks. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 88, 2540-2544.

Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. & Tingey, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18, 6531-6535.

Williams, S. M. & Strobeck, C. (1986). Measuring the multiple insemination frequency of *Drosophila* in nature: use of a Y linked molecular marker. *Evolution*, 40, 440-442.

Winship, P.R. (1989). An improved method for directly sequencing PCR amplified material using dimethyl sulphoxide. *Nucleic Acids Research*, 17, 1266.

Woese, C. (1987). Bacterial evolution. *Microbiological Reviews*, 51, 221-271. Wong, Z., Wilson, V., Patel, I., Povey, S., Jeffreys, A. J. (1987). Characterization of highly variable minisatellites cloned from human DNA. *Annals of Human Genetics*, 51, 269-288.

(魏伟译自 T.Burke, W. E.Reiney and T. J. White, 1992, *Molecular Variation and Ecological Problems*, in R. J. Berry, T. J. Crawford & G. M. Hewitt (eds.) 《Genes in Ecology》 229-254, Oxford: Blackwell Scientific Publications 钱迎倩 校)