

中国壁虎属 9 物种的 DNA 条码技术

严 洁, 马晓燕, 杜 婕, 周开亚

(江苏省生物多样性和生物技术重点实验室, 南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210046)

[摘要] 测定了无蹼壁虎、粗疣壁虎和中国壁虎共 17 个样品的 COI 基因部分片段, 结合其他已知序列, 对我国 9 种壁虎的 DNA 条码序列进行比较分析, 计算种间及种内平均遗传距离, 并构建系统发生树。结果显示所有 DNA 条码都为各物种所独有, 不存在物种之间的共享。属内种间差异明显大于种内差异, 且同一物种的不同个体均聚成高支持率的单系群, 提示该条码在壁虎属物种中有很好的识别能力, 可以用于物种鉴定。DNA 条码还为粗疣壁虎和铅山壁虎的物种有效性提供了有力的分子证据。

[关键词] DNA 条码, 细胞色素 *c* 氧化酶 I 壁虎属, 壁虎鉴定

[中图分类号] Q959.3 [文献标识码] A [文章编号] 1001-4616(2010)04-0084-07

DNA Barcoding of Nine Species of *Gekko* From China

Yan Jie, Ma Xiaoyan, Du Jie, Zhou Kaiya

(Jiangsu Key Laboratory for Biodiversity and Biotechnology, School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, China)

Abstract We determined partial sequence of the cytochrome *c* oxidase subunit I gene (COI) for 17 specimens from *Gekko swinhonis*, *G. scabridus* and *G. chinensis*. Combining that from another 6 geckos, DNA barcodes for 9 species of *Gekko* from China were compared. Average Kimura-2 parameter differences between and within species were calculated and the phylogenetic trees were reconstructed. Our results showed that all DNA barcodes were species specific; that is no sequence was shared in two species. Divergence between species was greater than that of within species, and individuals of the same species were clustered as highly supported monophyletic group, indicating the potential of DNA barcoding for species identification in genus *Gekko*. DNA barcodes also provide molecular evidence supporting the validity of *Gekko scabridus* and *Gekko hokouensis*.

Key words DNA barcode, cytochrome *c* oxidase subunit I, *Gekko*, gecko identification

壁虎属 (*Gekko*) 动物隶属爬行纲 (Reptilia)、有鳞目 (Squamata)、蜥蜴亚目 (Lacertilia), 分布于中国、韩国、日本、东南亚及南亚^[1]。加上 2008 年报道的新种——文县壁虎^[2], 中国记载的壁虎属种类已达到 12 种。可能由于栖息环境上的部分一致性, 如食性、聚集在有灯光照射处的墙壁上爬行等, 使该属种类存在某些性状上的趋同进化, 造成多种壁虎在形态上差别较小, 如粗疣壁虎 (*G. scabridus*)、多疣壁虎 (*G. japonicus*)、铅山壁虎 (*G. hokouensis*) 等^[3]。而传统用于分类的形态特征描述, 如鳞被 (lepidosis) 的特征、指趾形状及结构、身体各部的量度等^[2], 也会受到表型可塑性与遗传可变性的作用, 从而影响和混淆物种的正确区分。

随着分子生物学技术的发展以及分析手段的不断进步, 提出了基于分子手段进行物种鉴定的 DNA 分类学 (DNA taxonomy)^[4]。此后 Hebert 等提出设想, 利用线粒体细胞色素 *c* 氧化酶 I (COI) 基因的部分序列建立全球动物的 DNA 条码 (DNA barcode) 标准数据库, 并根据每个物种在该基因上的鉴别位点, 简单、快捷和有效地进行物种的识别和鉴定^[5]。随着更多研究工作的陆续开展, 在越来越多的动物类群中确认了 DNA 条码技术的有效性^[6-7], 加快了记录未知物种的速度^[7, 8], 减少了记录物种过程中对形态学的依赖, 同时也改变了物种鉴定的工作流程^[9-10]。

收稿日期: 2010-07-29

基金项目: 国家自然科学基金 (3100949, 30870286)、南京师范大学创新团队项目 (0319FM 0902)。

通讯联系人: 周开亚, 教授, 博士生导师, 研究方向: 动物学。E-mail: kyzhou@126.com

本研究对我国壁虎属 9种壁虎的 COI基因部分片段的序列,即标准 DNA 条码序列,进行比较分析,计算 Kimura双参数 (K2P)遗传距离,构建系统发生树,探讨 DNA 条码对壁虎属物种的识别鉴定能力。

1 材料和方法

实验使用无蹼壁虎 (*G. swinhonis*)、粗疣壁虎 (*G. scabridus*)和中国壁虎 (*G. chinensis*)的乙醇浸制样本共计 17个(表 1)。分别从尾部或腿部剪取小块肌肉组织,经无菌水浸泡尽可能除去乙醇后,用标准的蛋白酶 K 消化和酚/氯仿的方法提取出总基因组 DNA。总基因组 DNA 经 AxyPrep PCR Cleanup Kit (AxyGen)纯化后用作 PCR 扩增反应的模板。rCOI-1H (5'-TAGTGGGAARTGKGCTACTAC-3')和 rCOI-1L (5'-TAAAC-CARGRGCCCTTCAAAG-3')^[11]作为引物来扩增和测定 COI基因部分序列,包括位于该基因 5'端的标准 DNA 条码序列。反应体系为 50 μ L,其中包括 5.0 μ L 10 \times Buffer, 1.5 mmol/L MgCl₂, 0.1 μ mol/L 引物, 0.2 mmol/L dNTP, 5~10 ng模板 DNA, 以及 1.25U Taq DNA 聚合酶 (TaKaRa 大连宝生物公司)。扩增反应在 MJ Research PTC-200 PCR 仪上进行,反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 1 min, 然后先进行 5 次循环, 参数为 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 48 $^{\circ}$ C 退火 1.5 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5 min, 再进行 35 个循环, 参数为 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 58 $^{\circ}$ C 退火 1.5 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5 min, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸补齐 5 min^[12]。所有反应都设置空白对照, 以确保 PCR 体系中未发生污染。扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色, 紫外检测和纯化后, 在 ABI 3100 或 3730 型全自动遗传分析仪上进行双向测序。

双向测定的序列用 Lasergene 软件包中的 SeqMan 程序进行拼接, 并辅以人工校对。结合该属其他物种的 COI 基因序列^[2, 12, 13], 进行数据分析。序列的种属来源、GenBank 检索号等详细信息见表 1。疣尾蜥虎 (*Hemidactylus frenatus*)^[14]用作系统发生分析的外群。序列的比对 (alignment)、特征分析、计算种内和种间个体两两之间的 K2P 遗传距离, 以及用邻接法 (NJ Neighbor joining) 进行系统发生分析等都在软件 MEGA 4^[15]中完成。邻接树中分支的置信水平用自举检验 (Bootstrap test) 估计, 重复 500 次。贝叶斯树的构建在软件 MrBayes 3.1.2^[16]中进行, 最适进化模型及似然参数经 Modeltest 2.3^[17]选择和估算。根据所选 HKY + I + G 模型, 将参数设置为 Lset nst= 2 rates= invgamma 随机选取起始树, 计算 5×10^6 代, 每 100 代保存一棵树 (samplefreq= 100), 舍弃老化树 (burn-in) 后, 利用剩余的树获得一致树以及树中各节点的后验概率 (posterior probabilities)。

2 结果

3 种壁虎共 17 个样品的 COI 部分片段均成功扩增和测序 (GenBank 检索号: HM802938—HM802954), 通过比对找到 DNA 条码位置所在, 从而获得 652 bp 的条码序列。这些序列中, 没有发现插入、缺失以及终止密码子, 且碱基组成 (T: 31.2%, C: 25.7%, A: 25.0%, G: 18.1%) 与 GenBank 中其他已知壁虎属 COI 序列 (T: 31.2%, G: 27.4%, A: 22.8%, G: 18.6%) 相当, 表明并非核内假基因拷贝。对壁虎属 10 种壁虎 53 条 COI 条码序列进行比对, 发现有变异位点 283 个, 其中简约信息位点 279 个; 所有 DNA 条码都是物种独有的, 不存在物种之间的共享; 对所涉及的 10 个物种而言 (表 1), 每个物种都有各自的鉴别位点, 数目从 3 到 32 不等。

10 个物种的种内 K2P 遗传距离见表 2, 其中无蹼壁虎的种内遗传距离最大, 平均达到了 7.88%。考虑到无蹼壁虎种内在 Cytb 基因序列上存在分歧明显的 A、B 两大支系^[18], 它们在 COI 基因上的平均遗传距离 (13.33%) 明显大于种内遗传距离 (图 1), 因此在计算种内种间差异时采取 3 种处理方法: ①将无蹼壁虎支系间 (根据 Cytb 结果划分) 差异算作种内差异, 得到的种内个体两两 K2P 遗传距离最小为 0.00% (铅山壁虎, 只有一种单元型), 最大为 14.08% (无蹼壁虎, 表 2), 平均为 4.56%。种间遗传距离最小为 19.10%, 最大为 34.13%, 平均达到了 25.58%。种间与种内差异范围不重叠, 种间平均距离仅约为种内距离的 5.6 倍; ②将无蹼壁虎支系间差异排除在种内和种间差异之外, 此时种内距离为 0.00% ~ 8.22% (平均 2.49%), 种间种内距离比为 10.3; ③将无蹼壁虎支系间差异算作种间差异, 得到的种间距离为 12.99% ~ 34.13% (平均为 25.31%), 种间种内距离比为 10.2。

基于 10 个物种的 53 条 COI 序列间的 K2P 遗传距离, 使用邻接法构建的系统发生树如图 2 所示。同物种的不同个体都聚为一个单系, 且得到很好的支持 (节点处自举检验值为 99% ~ 100%)。不同物种之间

的界限十分清晰. 贝叶斯树(图 3)得到同样的结果, 所有的物种均各自聚为单系, 后验概率 0.99 以上. 在邻接树和贝叶斯树中, 除多疣壁虎与文县壁虎的姐妹群关系外, 壁虎属内其他种间的系统发生关系没有得到有效解决, 表现在种间关系的不一致以及偏低的支持率. 无蹼壁虎分支内部又分为两支, 分别对应基于 *Cyt b* 序列的 A (XY + LY)、B 支系 (XA), 两者都得到 100% 自举检验和 1.00 后验概率的支持. 支系之间的遗传距离达到 $13.33 \pm 1.53\%$, 远远超过其他壁虎的种内平均距离 (2.57% , 图 1)

表 1 样品及序列信息

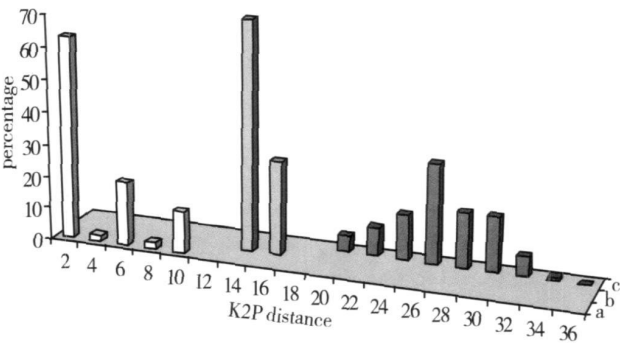
Table 1 Information of the samples and sequences used in the present study

种名	数量	采集地	GenBank检索号	参考文献
耳疣壁虎 <i>G. aurivernucosus</i>	4	山西运城 (YC)	EU417716—EU417719	Zhou & Wang 2008
中国壁虎 <i>G. chinensis</i>	1	广西南宁 (NN)	HM802954	This study
	3	福建福清 (FQ)	HM802951—HM802953	This study
	1	广西南宁	AY282753	Zhou et al 2006
大壁虎 <i>G. geko</i>	1	不详	HM370130	Qin et al., unpublished
铅山壁虎 <i>G. hokouensis</i>	3	安徽金寨 (JZ)	EU417720—EU417722	Zhou & Wang 2008
多疣壁虎 <i>G. japonicus</i>	4	浙江舟山 (ZS)	EU417723—EU417726	Zhou & Wang 2008
	2	江苏如皋 (RG)	EU417727—EU417728	Zhou & Wang 2008
	2	云南大理 (DL)	HM802949—HM802950	This study
粗疣壁虎 <i>G. saubridus</i>	2	云南巧家 (QJ)	HM802947—HM802948	This study
	2	云南永仁 (YR)	HM802945—HM802946	This study
	3	四川成都 (CD)	EU417713—EU417715	Zhou & Wang 2008
蹼趾壁虎 <i>G. subpalma tus</i>	4	陕西西安 (XA)	EU417709—EU417712	Zhou & Wang 2008
无蹼壁虎 <i>G. sinhonis</i>	5	陕西旬阳 (XY)	HM802938—HM802942	This study
	2	山东临沂 (LY)	HM802943—HM802944	This study
	6	甘肃文县 (WX)	EU417703—EU417708	Zhou & Wang 2008
白脊壁虎 <i>G. vittatus</i>	8	哈马黑拉岛, 印尼	FJ952240—FJ952247	Setiadi et al., 2009
疣尾蜥虎 <i>Hemidactylus frenatus</i>	1	海南岛尖峰岭	GQ245970	Yan et al., 2009

表 2 DNA 条码序列在壁虎属各个物种内的遗传歧异

Table 2 Genetic divergence within each species of *Gekko*

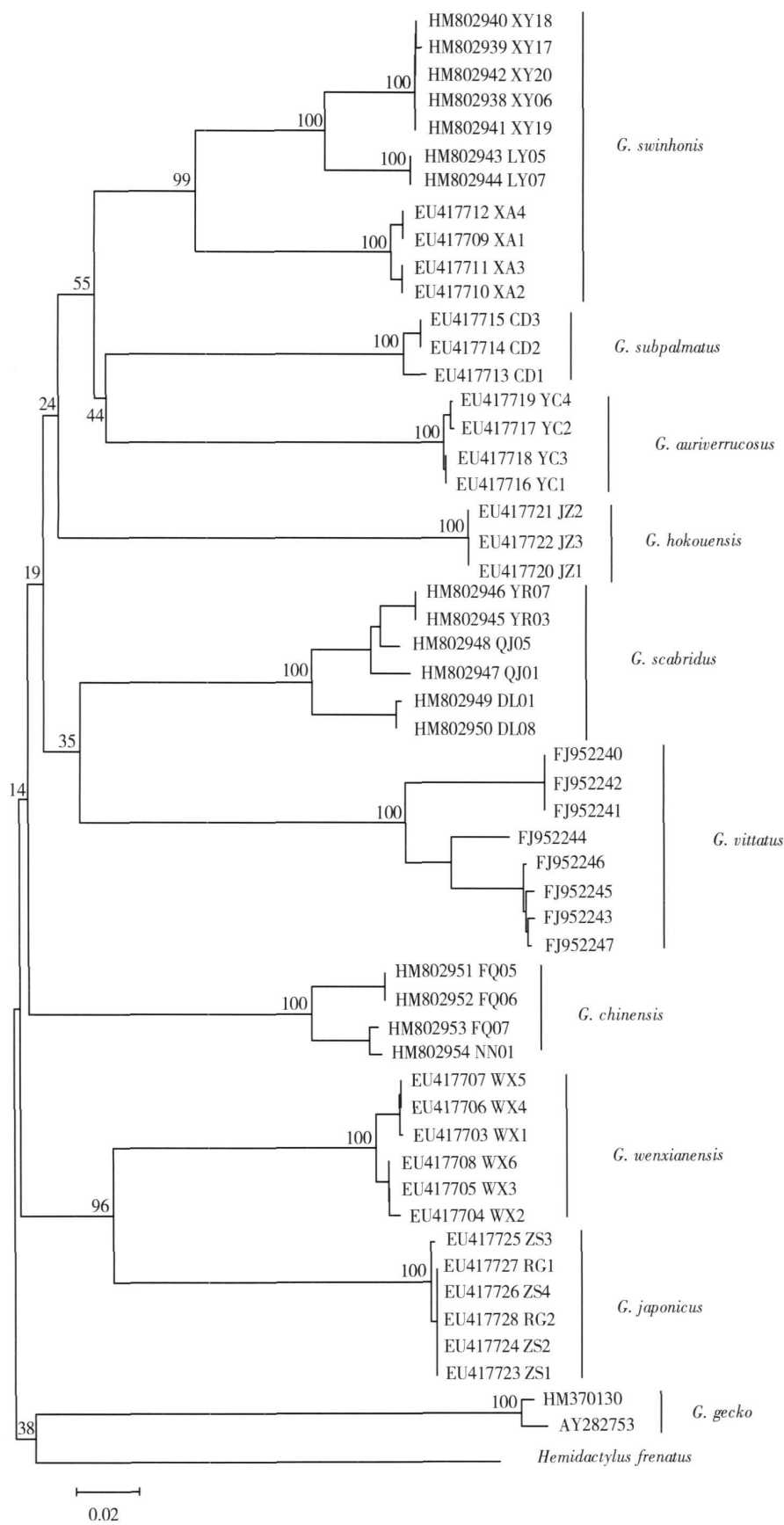
种名	最大值	最小值	平均值	标准差
<i>G. aurivernucosus</i>	0.0046	0.0000	0.0028	0.0016
<i>G. chinensis</i>	0.0464	0.0000	0.0308	0.0055
<i>G. geko</i>	—	—	0.0124	0.0042
<i>G. hokouensis</i>	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
<i>G. japonicus</i>	0.0031	0.0000	0.0010	0.0007
<i>G. saubridus</i>	0.0631	0.0000	0.0383	0.0055
<i>G. subpalma tus</i>	0.0124	0.0000	0.0083	0.0028
<i>G. sinhonis</i>	0.1408	0.0000	0.0788	0.0082
<i>G. wuxianensis</i>	0.0140	0.0000	0.0084	0.0026
<i>G. vittatus</i>	0.0822	0.0000	0.0503	0.0064



a.除无蹼壁虎 A、B 支系间差异以外的种内遗传距离;b.无蹼壁虎 A、B 支系之间的距离;c.壁虎属 10 物种的种间遗传距离

图 1 COI 条码序列 K2P 遗传距离 (百分数) 在不同组别的分布

Fig.1 Distribution of K2P distances (percent) for COI within different groups



分支上的数值为 500 次重复得到的自举检验值

图 2 基于 COI 条码序列构建的邻接树

Fig.2 Neighbor-joining tree of COI barcode sequences

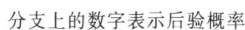


Fig.3 Bayesian tree of COI barcode sequences

3 讨论

— 88 —

支系间的分歧可能接近或达到物种级的分歧^[18]. 本研究的结果表明, 这种分歧在 COI 基因上同样存在, 且遗传距离达到 $13.33 \pm 1.53\%$, 远远超过其他 9 种壁虎的种内平均遗传距离 (2.57%). 在对无蹼壁虎支系间遗传距离做了 3 种不同处理后, 发现将其作为种内距离处理时, 得到的属内种间平均距离仅为种内距离的 5.6 倍, 不符合识别鉴定物种的所谓 $10\times$ 法则, 即种间差异超过平均种内差异 10 倍以上^[19]; 若计算时不考虑无蹼壁虎的支系间距离, 或将此距离算作种间差异时, 所得到种间种内差异比均达到 10 以上, 符合 $10\times$ 法则. 由于用 3 种方法计算得到的属内种间距离与种内距离均不重叠, 即各自具有不同的范围, 且每个物种在 COI 序列上都具有各自的鉴别位点, 因此即便第一种算法得到的种间种内差异比小于 10 并不影响 COI 序列对各物种的鉴别能力. 另外系统发生分析的结果显示, 同一物种的不同个体均形成高支持率的单系, 不同物种间的界限清晰. 以上结果均提示, COI 条码序列在壁虎属的这些物种中有很好的识别能力, 可以用于物种鉴定.

无蹼壁虎种内存在基于 Cyt b 序列划分的 A、B 两大支系, 它们在 Cyt b 基因上的平均遗传差异为 14% ^[18], 在 COI 基因上的遗传差异也达到了 $13.33 \pm 1.53\%$, 远远超过其他 9 种壁虎的种内平均遗传距离 (2.57%). 从差异分布范围来看 (图 1), A、B 支系之间的距离 (b) 与除其以外的种内遗传距离 (a) 及壁虎属 10 物种的种间遗传距离 (c) 之间不存在重叠, 且分布范围处于后两者之间. 若将此距离算作种间距离, 那么这两大支系间的距离与壁虎属平均种内距离之比为 5.2 根据 $10\times$ 法则, 不能将两大支系判定为不同的物种. 但将 A、B 支系之间的距离算作种内差异时, 得到的壁虎属 10 个物种的平均种间种内差异比 (5.6) 也同样不符合 $10\times$ 法则. 因此, 无蹼壁虎种内确实存在显著的遗传分歧, 这两大支系是处在新物种的形成过程中, 还是已经分化成为新的物种? 这是有待于进一步解决的课题.

中国记载的壁虎属种类已达到 12 种^[2], 不过这些物种之间的系统发生关系并不是很明确, 粗疣壁虎和铅山壁虎的有效性曾存在争议^[3 21]. 本研究基于 COI 序列对壁虎属 10 个物种 (中国产 9 种) 的分析, 仍不能有效解决它们之间的系统发生关系. 壁虎属已知的物种数超过 30 个, 本研究基于 10 种壁虎的 COI 条码序列, 未能为壁虎属的系统发生关系提供足够的信息. 但在物种的有效性检验方面, DNA 条码技术可以提供有力的佐证.

粗疣壁虎 *Gekko scabridus* 是 1982 年由刘月珍和周开亚根据云南永仁县的标本描述的物种^[22]. 到目前为止, 几乎没有对这一物种在细胞学、生理生态学和分子生物学等方面的研究报道. 对其物种有效性的质疑来自 Zhao 和 Adler 他们认为粗疣壁虎是中国壁虎 *Gekko chinensis* 的同物异名^[21]. 而杨大同和饶定齐在记述云南两栖爬行类物种时, 认定粗疣壁虎是有效种^[23]. 本文的结果显示, 粗疣壁虎与中国壁虎在 COI 序列上有 82 个鉴别位点; 种间遗传距离达 22.45% ; 且来自云南 3 个样地的 6 只粗疣壁虎聚为一支, 并没有表现出与中国壁虎较近的亲缘关系 (图 2). BI 树显示粗疣壁虎与除中国壁虎、大壁虎外的另外 6 种壁虎聚为姐妹群, 且得到 0.97 的后验概率支持 (图 3). 因此, 本文的 DNA 条码从分子水平进一步证明粗疣壁虎确为有效种.

多疣壁虎 *Gekko japonicus* 和铅山壁虎 *Gekko hokouensis* 是 2 个在形态学上相似的物种. 前者是 1836 年命名的. 后者是 1928 年命名的, 当时 Pope 把它作为多疣壁虎的 1 个亚种, *Gekko japonicus hokouensis* Pope. 1982 年, 周开亚等根据对 1000 多号多疣壁虎标本的观察, 发现铅山亚种壁虎的尾基部每侧 1 个肛疣, 多疣壁虎每侧 3 个肛疣, 将“铅山亚种”重新描述为一个独立的物种铅山壁虎^[22]. Ota^[24] 和 Ota 等^[25] 先后对琉球群岛和台湾省的大量壁虎标本进行研究, 发现所查看的标本全都属于铅山壁虎, 强有力地支持铅山壁虎为独立物种. 染色体^[26]、同工酶^[27] 和分子系统学研究^[28] 也支持铅山壁虎为有效种. 然而杜世章等认为上述证据并不充分, 且彼此之间在种间关系上存在矛盾, 因而对铅山壁虎的种级地位存有疑问^[3]. 本文的结果显示, 铅山壁虎与多疣壁虎种间遗传距离达 26.91% ; 在系统发生分析中没有聚为单系. 故 DNA 条码可以为铅山壁虎是有效种的说法提供又一有力的证据.

[参考文献]

- [1] 周开亚. 壁虎属 (*Gekko Laurenti* 1768). 中国动物志爬行纲 (第二卷) 有鳞目蜥蜴亚目 [M]. 北京: 科学出版社, 1999 31-53.

- [2] Zhou K Y, Wang Q X. New species of *Gekko* (Squamata: Sauria: Gekkonidae) from China: morphological and molecular evidence[J]. *Zootaxa*, 2008, 1778: 59-68.
- [3] 杜世章, 陈立侨, 刘定震. 中国壁虎属 *Gekko* 动物系统学研究进展 [J]. *四川动物*, 2002, 21(3): 200-204.
- [4] Tautz D, Arctander P, Minelli A, et al. A plea for DNA taxonomy[J]. *Trends in Ecology and Evolution*, 2003, 18(2): 70-74.
- [5] Hebert P D N, Cyw inska A, Ball S L, et al. Biological identifications through DNA barcodes [J]. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B: Biological Sciences*, 2003, 270(1512): 313-321.
- [6] Hajibabaei M, Janzen D H, Burns J M, et al. DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006, 103(4): 968-971.
- [7] Hebert P D N, Penton E H, Burns J M, et al. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2004, 101(41): 14 812-14 817.
- [8] Pfenninger M, Nowak C, Key C, et al. Utility of DNA taxonomy and barcoding for the inference of larval community structure in morphologically cryptic *Chironomus* (Diptera) species[J]. *Molecular Ecology*, 2007, 16(9): 1 957-1 968.
- [9] Clare E L, Lim B K, Engstrom M D, et al. DNA barcoding of Neotropical bats: species identification and discovery with in Guyana[J]. *Molecular Ecology Notes*, 2007, 7(2): 184-190.
- [10] Kerr K C R, Stoeckle M Y, Dove C J, et al. Comprehensive DNA barcode coverage of North American birds[J]. *Molecular Ecology Notes*, 2007, 7(4): 535-543.
- [11] Kumazawa Y, Endo H. Mitochondrial genome of the Komodo dragon: efficient sequencing method with reptile-oriented primers and novel gene rearrangements[J]. *DNA Research*, 2004, 11(2): 115-125.
- [12] Zhou K Y, Li H D, Han D M, et al. The complete mitochondrial genome of *Gekko gekko* (Reptilia: Gekkonidae) and support for the monophyly of Sauria including Amphisbaenia[J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2006, 40(3): 887-892.
- [13] Setiadi M I, Hamidi A, Abidin Z, et al. Genetic structure of herpetofauna on Hainahera Island, Indonesia: implications for Aketajawe Loloabata National Park[J]. *Conservation Biology*, 2010, 24(2): 553-562.
- [14] Yan J, Zhou J L, Tian C, et al. Complete nucleotide sequence and gene organization of the mitochondrial genome of common house gecko *Hemidactylus frenatus*[J]. *Journal of Nanjing Normal University: Natural Science Edition*, 2009, 32(4): 77-82.
- [15] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, 24(8): 1 596-1 599.
- [16] Ronquist F, Huelsenbeck J P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models[J]. *Bioinformatics*, 2003, 19(12): 1 572-1 574.
- [17] Nylander J A A. MrModeltest v2: Program distributed by the author[CP/DK]. Uppsala University: Evolutionary Biology Centre, 2004.
- [18] Yan J, Wang Q X, Chang Q, et al. The divergence of two independent lineages of an endemic Chinese gecko *Gekko swinhonis* launched by the Qinling orogenic belt[J]. *Molecular Ecology*, 2010, 19(12): 2 490-2 500.
- [19] Hebert P D, Stoeckle M Y, Zamalak T S, et al. Identification of Birds through DNA Barcodes[J]. *PLoS Biology*, 2004, 2(10): 1 657-1 663.
- [20] Yoo H S, Eah J Y, Kim J S, et al. DNA barcoding Korean birds[J]. *Molecules and Cells*, 2006, 22(3): 323-327.
- [21] Zhao E, Adler K. Herpetology of China[M]. Oxford: Society for the Study of Amphibians and Reptiles, 1993: 1-522.
- [22] 周开亚, 刘月珍, 李德俊. 壁虎属三新种兼记铅山壁虎(蜥蜴目: 壁虎科)[J]. *动物分类学报*, 1982, 10(4): 438-446.
- [23] 杨大同, 饶定齐. 云南两栖爬行动物[M]. 昆明: 云南出版集团公司和云南科技出版社, 2008: 1-411.
- [24] Ota H. A review of reptiles and amphibians of the Amami Group, Ryukyu Archipelago[R]. *Memoir of Faculty Science, Kyoto University: Series Biology*, 1986, 11: 57-71.
- [25] Ota H, Lue K Y, Chen S H, et al. Taxonomic status of the Taiwanese *Gekko*, with comments on the synonymy of *Luperosaurus amissus* Taylor[J]. *Journal of Herpetology*, 1989, 23(1): 76-78.
- [26] 陈俊才. 壁虎属 3 种壁虎的核型研究 [J]. *两栖爬行动物学报*, 1986, 5(1): 24-29.
- [27] 沈建伟, 陆佩洪, 陈宜峰. 壁虎属三种壁虎几种组织中 LDH 同工酶的比较 [J]. *南京师大学报: 自然科学版*, 1996, 19(4): 45-47.
- [28] 韩德民, 周开亚, 王义权. 从 12S rRNA 基因序列探讨中国 10 种壁虎的系统关系 [J]. *动物学报*, 2001, 47(2): 139-144.

[责任编辑: 孙德泉]