

网纹蟒非入侵式采样和线粒体基因组分析

白天, 何叶艳, 高旭龙, 赵阿勇, 何珂

(浙江农林大学 动物科技学院, 浙江 杭州 311300)

摘要: 采用非入侵式采样, 提取网纹蟒 *Python reticulatus* 粪便和新鲜蛇蜕的基因组, 探讨非入侵式采样在蛇类研究中的可能性。利用聚合酶链式反应(PCR)测定和拼接网纹蟒线粒体基因组全序列, 结合 GenBank 中蟒科 Pythonidae 线粒体基因组全序列, 对蟒科物种进行比较分析。结果发现: 蛇蜕中提取的 DNA 优于粪便, 液氮处理能提高 DNA 质量浓度。网纹蟒线粒体基因组全长 17 641 bp, 基因排布和结构同蟒科物种一致, 但部分基因起始密码子和终止密码子存在差异。根据系统发育树分析推测, 与蚺科 Boidae 相比, 蟒科和闪鳞蛇科 Xenopeltidae 进化关系更接近。对蛇类物种进化过程的分析发现: 热点区域存在 2 个相似度非常高的控制区, 系统树上的拓扑结构呈簇状排列, 推测 2 个控制区的结构来源于一个祖先。这种种内进化的模式为协同进化。图 3 表 2 参 15

关键词: 动物学; 网纹蟒; 非入侵式采样; 蛇蜕; 线粒体; 进化

中图分类号: S863; Q754 **文献标志码:** A **文章编号:** 2095-0756(2019)03-0444-07

Non-invasive sampling and mitochondrial genome analysis in *Python reticulatus*

BAI Tian, HE Yeyan, GAO Xulong, ZHAO Ayong, HE Ke

(College of Animal Science and Technology, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China)

Abstract: To explore the possibility of non-invasive sampling in snake research, feces and fresh snake sloughs for genome extraction from *Python reticulatus* (reticulated python) were used. Furthermore, Polymerase Chain Reaction (PCR) was taken, and the full sequence of mitochondrial genome was analyzed with mitochondrial genome dates in GenBank. Results showed that (1) the quality of DNA extracted from snake sloughs was better than that of feces, and the concentration of DNA extracted by liquid nitrogen treatment was higher. (2) The complete sequence of the mitochondrial genome was obtained for a length of 17 641 bp with gene arrangement and structure being consistent with the Pythonidae species. However, there were differences in the start codons and stop codons of some genes. (3) Inferred from the phylogenetic tree analysis, the evolutionary relationship was speculated as (Pythonidae, Xenopeltidae and Boidae). (4) Analysis of the hotspots in species evolution showed that similarity was very high in the two control regions, and they were clustered by species in the phylogenetic tree. Thus, it was presumed the structures of the two control regions originated from the same ancestor, and this intraspecific evolution was due to co-evolution. [Ch, 3 fig. 2 tab. 15 ref.]

Key words: zoology; *Python reticulatus*; non-invasive sampling; snake slough; mitochondrial genome; evolution

网纹蟒 *Python reticulatus* 属于蛇亚目 Serpentes 原蛇附目 Henophidia 蟒科 Pythonidae, 广泛分布于东南亚, 在印度尼西亚存在海岛变体^[1], 其皮张被认为是皮毛产业奢侈品的来源, 是东南亚重要的经济自然资源。目前, 该物种被世界自然保护联盟评估为易危等级(vulnerable species, VU)^[2], 属于濒危动植物种国际贸易公约附录 II 物种。受捕猎影响, 该物种在东南亚各国不同地区的种群遗传多样性已遭到破

收稿日期: 2018-05-01; 修回日期: 2018-09-18

基金项目: 浙江省大学生科技创新活动计划暨新苗人才计划资助项目(2018R412020)

作者简介: 白天, 从事野生动物繁殖育种研究。E-mail: 727586976@qq.com。通信作者: 何珂, 从事野生动物保护和分子生态学研究。E-mail: heke@zafu.edu.cn

坏, 亟待有计划的种群复苏和保护工作^[3]。蛇类进化历史久远, 生存环境复杂多样, 但其形态特征相对较为保守, 加上趋同进化, 造成可用于蛇类系统学研究的形态方面信息较少, 因此, 依据形态学信息很难解决蛇类系统关系。生物分子所具有的信息量大、完全不相同、较为真实记录生物进化信息等特点, 可弥补形态学信息的不足, 越来越多地被应用到蛇类系统发生的研究中^[4]。研究认为: 作为一个与能量代谢有关的细胞器, 真核生物的线粒体具有相对独立的遗传物质即线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA), 研究线粒体基因组并利用线粒体 DNA 全序列分析进行系统建树, 能够克服单个基因仅能带来的有限信息, 更加全面地揭示物种进化与系统发生。目前关于网纹蟒的分子生物学研究仅集中在几个线粒体基因相关的系统分析上^[3], 在线粒体全基因组方面上存在欠缺。本研究拟采用无损性取样, 提取网纹蟒线粒体 DNA, 通过聚合酶链式反应(PCR)扩增拼接得到线粒体基因组全序列, 以评估非入侵式采样在蛇类研究中的可行性; 以网纹蟒线粒体基因组序列信息和结构特征分析为依据, 结合 GenBank 中近缘物种(蟒科, 蚺科 Boidae 和闪鳞蛇科 Xenopeltidae)已发现的线粒体基因组序列, 构建系统发生树, 探讨蛇亚目的系统发生关系, 并结合蛇亚目线粒体基因组不同的排列顺序来讨论蛇亚目线粒体基因组的重排。

1 材料与方法

1.1 试验样品

试验所用网纹蟒的蛇蜕和新鲜粪便均来源于杭州动物园, 于每日喂食时观察并收集得到。粪便用体积分数 70%乙醇浸泡, 蛇蜕用体积分数 95%的乙醇固定, 带回实验室后保存于-20 °C的冰箱中备用。

1.2 基因组 DNA 的提取

粪便样品分离表面和内层部分 2 种, 蛇蜕样品剪碎后一部分室温下研磨, 另一部液氮研磨至粉碎。各样品取 3 次重复, 基因组 DNA 提取参考文献[5]方法。经 NanoDrop™ 3300 检测计算质量浓度和纯度 $D(260)/D(280)$ 。

1.3 片段扩增

根据亲缘物种的线粒体基因组序列设计扩增引物, 采用高保真酶(Phanta® Super Fidelity DNA Polymerase, 诺唯赞, 南京)进行扩增, PCR 产物经电泳确定大小符合要求时, 交由上海博尚生物公司测序。若 PCR 产物呈现多条带, 则采用割胶回收试剂盒获取目的大小片段, 用 pMD-19T 质粒(TaKaRa, 大连)连接, 选取阳性克隆后送出测序。

1.4 数据分析

(1)网纹蟒线粒体基因组各基因、tRNA 长度和基因起始密码子分析。用 Dnastar 软件包拼接测序序列, 用 tRNA scan(<http://lowelab.ucsc.edu/tRNAscan-SE/>)确定 tRNA 的位置和类型, 采用 OGDRAW(<https://chlorobox.mpimp-golm.mpg.de/OGDraw.html>)绘制网纹蟒线粒体结构及基因结构图。在分析过程中, 网纹蟒记为 RP, 以蟒科的缅甸蟒 *Python bivittatus* (PB, NC_021479), 印度蟒 *Python molurus* (PM, NC_015812)和球蟒 *Python regius* (PR, NC_007399)作为对比。(2)根据相关基因、控制区(control region)和线粒体基因组全序列建树分析蟒科、蚺科和闪鳞蛇科的进化关系。用 Mega 5.0 软件^[6]比对序列及构建系统进化树, 蟒科物种为缅甸蟒、印度蟒和球蟒, 蚺科物种为红尾蚺 *Boa constrictor* (BC, NC_007398)和玫瑰蚺 *Charina trivirgata* (CT, GQ200595), 闪鳞蛇科物种为闪鳞蛇 *Xenopeltis unicolor* (XU, NC_007402), 以原蛇亚目的圆环蛇 *Anilius scytale* (AS, GQ200593)作为外类群。(3)蛇类具有多种线粒体结构排布次序, 采用 OGDRAW 软件绘制各蛇类线粒体基因结构图可清楚地分析线粒体基因在进化过程中的变动。对分属不同科属的 11 个物种构建系统进化树, 分别为缅甸蟒、球蟒、红尾蚺、闪鳞蛇和存在 1 个控制区和 tRNA-^{WQANCY} 基因簇的细盲蛇科 Leptotyphlopidae 物种西南细盲蛇 *Rena humilis* (RH, NC_005961), 含有 2 个控制区和存在 tRNA-^P 复制的蝰科 Viperidae 物种冲绳烙铁头 *Ovophis okinawensis* (OO, NC_007397)和美洲蝮 *Agkistrodon piscivorus* (AP, EF669477), 含有 2 个控制区和存在 tRNA-^P 复制的游蛇亚科 Colubridae 物种北美玉米蛇 *Pantherophis slowinskii* (PS, NC_009769)和半棱鳞链蛇 *Dinodon semicarinatus* (DS, NC_001945), rRNA 长度存在增加和含有 tRNA-^{L(Q)M} 和 tRNA-^{W(ANCY)} 结构的疣鳞蛇科 Acrochordidae 物种疣鳞蛇 *Acrochordus granulatus* (AG, NC_007400)和管蛇科 Cyliodrophiidae 物种红尾管

蛇 *Cylindrophis ruffus* (CR, NC_007401)。

2 结果与分析

2.1 样品基因组检测

对提取到的 DNA 的检测发现, 蛇蜕样品 DNA 质量浓度最高, 粪便表层次之, 粪便内层最低; 粪便内层样品 $D(260)/D(280)$ 最高, 说明样品 DNA 纯度较差, 其他样品的 $D(260)/D(280)$ 均为 1.7~1.8, 符合后续实验要求(表 1)。PCR 扩增试验显示: 室温或液氮研磨, 蛇蜕样品中提取的基因组 DNA 均能扩增出长度为 1 000~1 500 bp 的片段; 而来源于粪便表层或内层样品的基因组扩增得到 700~1 000 bp 片段和 1 000~1 500 bp 片段的效果均不佳。

表 1 所采用的样品类型提取 DNA 和扩增情况

Table 1 Genomic DNA extracted from different types of samples and the success rate of PCR

样品类型	$\rho_{DNA}/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	$D(260)/D(280)$	扩增 1 成功率/%	扩增 2 成功率/%
粪便表层样品	328.63 ± 161.67	1.78 ± 0.03	80	20
粪便内层样品	15.83 ± 4.45	1.87 ± 0.04	20	0
蛇蜕样品-液氮处理	$2\ 116.73 \pm 171.84$	1.73 ± 0.02	100	100
蛇蜕样品-室温处理	$1\ 284.33 \pm 211.12$	1.69 ± 0.04	100	100

说明: 扩增引物均为 5 对。扩增 1 得到产物长度 700~1 000 bp 为成功; 扩增 2 得到产物长度 1 000~1 500 bp 为成功

2.2 蟒科蛇类线粒体基因组分析

对 PCR 扩增产物进行测序和序列拼接, 得到长度为 17 641 bp 的网纹蟒线粒体基因组完整序列 (GenBank: MH410033)(图 1), 序列含 2 个 rRNA 基因, 13 个编码区, 22 个 tRNA 基因和 2 个控制区(表 2)。其中重链编码 28 个基因, 轻链编码 9 个基因。包含的 2 个 rRNA 基因(12S rRNA 和 16S rRNA)位置和其余蛇类相同。除了 *NADH6*(ND6)之外, 其余 12 个蛋白编码基因均位于重链上; 所有蛋白基因都没有内含子, 但和相邻的基因存在少许重叠或间隔。发现的 22 个 tRNA 基因存在蛇类特有的 LQM 和 WANCY 基因簇。2 个控制区位于非编码区, 长度分别为 1 271 和 1 196 bp, 序列相似度为 96.68%。

对蟒科物种相关基因的长度、起始密码子和终止密码子的分析发现, 4 个物种之间存在较高的同源性。网纹蟒的 *NADH2*(ND2)终止密码子和 *ATP8* 起始密码子与其他物种不同, 是物种所特有的; *NADH6*(ND6)基因变异最大, 起始密码子仅 2 个物种一致, 终止密码子缅甸蟒不同于其余 3 个物种。*COX2* 基因和 *NADH1*(ND1)较为保守, 前者 4 个物种均以 TA 为终止密码子, 后者则使用单碱基 T 作为

表 2 蟒科蛇类的线粒体蛋白质基因长度、起始密码子、终止密码子和 rRNA

Table 2 Comparison of length, start codon and stop codon in Pythonidae

基因	长度/bp	起始密码子	终止密码子
12S	1 292		
16S	1 514/ 1 511/ 1 512/ 1 512		
<i>NADH1</i> (ND1)	967/ 967/ 964/ 964	ATA	T
<i>NADH2</i> (ND2)	1 032	ATA	AGA/TAA/TAA/TAA
<i>COX1</i>	1 602	GTG	AGA
<i>COX2</i>	686	GTG	TA
<i>ATP8</i>	171/ 171/ 168/ 168	GTG/ATG/ATG/ATG	TAA
<i>ATP6</i>	681	ATG	TAA
<i>COX3</i>	784	ATG	CAT
<i>NADH3</i> (ND3)	343	ATT	AAT
<i>NADH4L</i> (ND4L)	291	ATG	TAA
<i>NADH4</i> (ND4)	1 356	ATG	AGA
<i>NADH5</i> (ND5)	1 794/ 1 788/ 1 794/ 1 794	ATG	TAA
<i>NADH6</i> (ND6)	513	ATA/TCT/ATG/ATG	AGG/AGA/AGG/AGG
<i>Cytb</i>	1 114/ 1 114/ 1 111/ 1 111	ATG	T

说明: 各比较项中, 当不同物种间存在差异时, 表达顺序为网纹蟒、缅甸蟒、印度蟒和球蟒

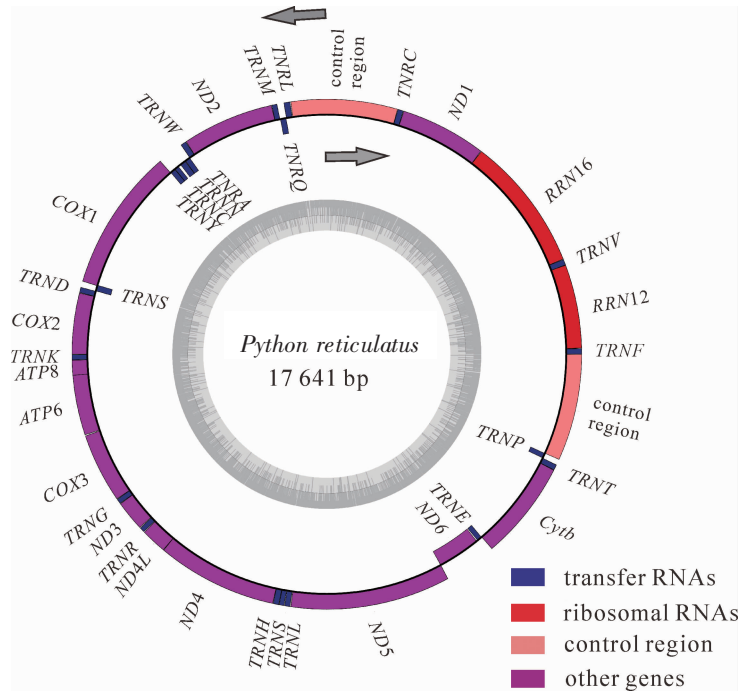


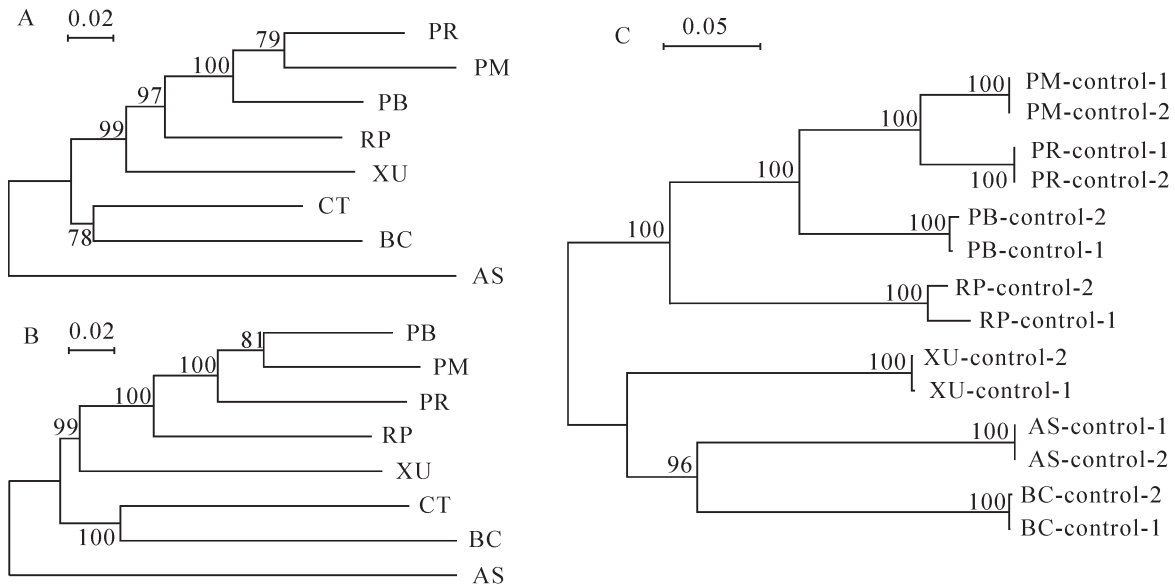
图 1 网纹蟒线粒体基因组结构示意图

图 1 Schematic diagram of mitochondrial genome structure in *Python reticulatus*

不完全终止密码子。

2.3 蟒科和蚺科物种进化分析

利用相关基因、控制区和线粒体基因组全序列构建系统树。分析发现：用蛋白基因构建的系统树拓扑结构较为相近；以 *Cytb* 基因为例(图 2A)，蟒科物种聚集的支持率为 97%(PR, PM, PB 和 RP 枝)，就亲缘关系而言，闪鳞蛇科(XU)比蚺科(BC 和 CT)更接近蟒科(图 2A)。用线粒体基因组全序列构建的系统树则表明：蟒科(PR, PM, PB 和 RP 枝)和蚺科(BC 和 CT 枝)各自聚为一枝，支持率都为 100%；同样，闪鳞蛇科比蚺科更接近蟒科(支持率 99%)(图 2B)。由于数据库中玫瑰蚺(CT)的 2 个控制区长度仅为 288 和 553 bp，和其他数据存在明显差异，因此删除该序列后对其他 7 个物种进行基于控制区的系



A. 基于 *Cytb* 基因的系统树构建；B. 基于线粒体基因组全序列的系统树构建；
C. 基于控制区的系统树构建。每个物种具有 2 个控制区，图中用 control-1 和 control-2 表示

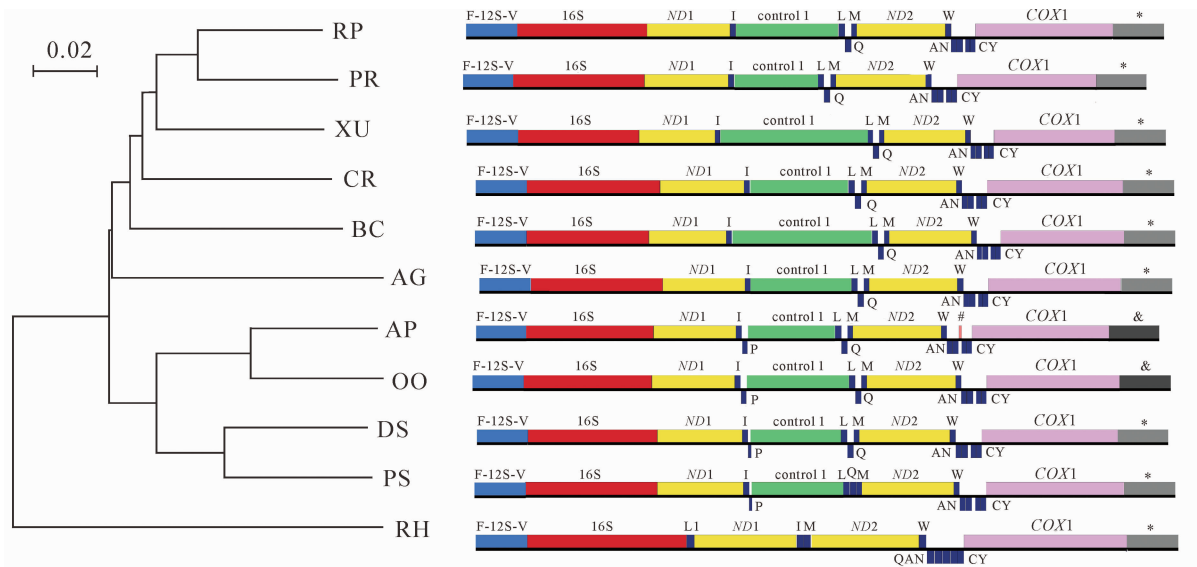
图 2 蟒科、闪鳞蛇科和蚺科的系统发育树

Figure 2 Phylogenetic relationship between Pythonidae, Xenopeltidae and Boidae

统树构建。分析发现：各物种的2个独立的控制区均先聚类，物种间的控制区聚类关系表明蟒科的支持率为100%，而闪鳞蛇、蚺科和圆环蛇则为另外一支(图2C)。以上结果表明：来源于同个物种的控制区相似度更高；相较于蚺科，闪鳞蛇科和蟒科的进化关系更接近。

2.4 蛇亚目物种线粒体结构排步分析

和其他脊椎动物线粒体基因组全序列的比较发现，蛇亚目物种长度大小变化较大，主要原因为控制区的长度和数量不同，基因组上存在一些重复序列区域。对不同物种线粒体结构序列进行分析并构建系统树(图3)，结果发现存在3种不同的基因结构，结构一主要存在于蟒科(RP和PR)，闪鳞蛇科(XU)，蚺科(BC)和疣鳞蛇科(AG和CR)中，含有2个控制区及tRNA^{-L(QM)}和tRNA^{-W(ANCY)}结构；结构二存在于蝮亚科(OO和AP)和游蛇科(DS和PS)，和结构一的差异在于在tRNA^{-I}和控制区1中多了1个tRNA^{-P}；相比于结构二，结构三的tRNA^{-L(QM)}基因簇中，tRNA^{-Q}产生了基因轻重链的转化，形成了tRNA^{-LQM}；而结构四(代表为盲蛇总目RH)则为仅存在1个控制区，tRNA^{-I}产生了移位，挪动至ND1前，而tRNA^{-L(QM)}和tRNA^{-W(ANCY)}通过移位分别转变为tRNA^{-IM}和tRNA^{-W(QANCY)}。



* 表示序列：(S)-D-COX2-K-ATP8-ATP6-COX3-G-ND3-R-ND4L-ND4-H-S2-L-ND5-(ND6)-(E)-Cytb-T-P-control 2；
 & 表示序列：(S)-D-COX2-K-ATP8-ATP6-COX3-G-ND3-R-ND4L-ND4-H-S2-L-ND5-(ND6)-(E)-Cytb-T-control 2；
 # 表示轻链的重复起始位点。F 表示 tRNA-F；V 表示 tRNA-V；I 表示 tRNA-I；P 表示 tRNA-F；L 表示 tRNA-L；
 Q 表示 tRNA-Q；M 表示 tRNA-M；W 表示 tRNA-W；A 表示 tRNA-A；N 表示 tRNA-N；C 表示 tRNA-C；
 Y 表示 tRNA-Y；S 表示 tRNA-S；D 表示 tRNA-D；K 表示 tRNA-K；G 表示 tRNA-G；R 表示 tRNA-R；
 H 表示 tRNA-H；E 表示 tRNA-E；T 表示 tRNA-T

图3 不同基因结构的线粒体基因组系统进化树及基因结构示意图

Figure 3 Phylogenetic tree of mitochondrion based on different gene structures and the rank of variable area

3 讨论

3.1 非入侵式采样在蛇类研究中的应用

在野生濒危动物中采集血液和脏器等常规样品非常困难，要建立濒危动物的物种基因库，亟待寻找新的采样方法。研究认为：通过提取粪便DNA或其他生物痕迹DNA等非入侵式采样方法能够为遗传学和生态学研究提供有效信息，在检测种群大小、物种饮食结构和大量物种的激素信息上具有现实意义^[7]。蛇类的蜕皮行为为非入侵式采样提供了实例。KHEDKAR等^[8]提取92份蛇蜕样品基因组，通过DNA条形码技术鉴定出了23种蛇类，但部分样品不能有效进行扩增。石林春等^[9]在利用蛇蜕鉴定中药材中的蛇类物种来源时发现，采用线粒体细胞色素C氧化酶I亚基(COI)作为引物，扩增片段不超过1000bp。网纹蟒是目前已知最长的蟒蛇，在东南亚国家捕杀严重，已被列为易危等级。本研究以粪便样品和新鲜蛇蜕为材料提取基因组DNA，发现相较粪便样品，蛇蜕样品扩增得到的片段长度更长(1000~1500bp)，

液氮研磨能有效提高DNA的提取品质, 满足后续实验要求。粪便样品由于提取的DNA品质和质量浓度不佳, 在长片段扩增中效率低下, 因此不建议使用。

3.2 蟒科和蚰科物种进化

本研究第1次完整地解析了网纹蟒的线粒体全基因组结构, 填补了网纹蟒线粒体基因组全序列的空白。分析发现: 网纹蟒的基因结构、tRNA顺序和控制区位置等均与蟒科物种一致, 但也发现存在物种特异的特征, 如 *NADH2* 以 AGA 作为终止密码子, *ATP8* 以 GTG 作为起始密码子, *NADH6* 以 ATA 作为起始密码子, 这3点均不同于其他蟒科已报道的物种(表2)。

关于蟒科和蚰科物种的分子系统相关研究, 主要采用部分线粒体基因结合核基因进行; 由于线粒体全基因不能通过简单扩增得到, 在分析物种进化过程中尚未广泛使用^[4,10]。但线粒体全基因组包含的信息更多, 在解释进化关系时更具有说服力^[11]。本研究结合多个线粒体基因(*Cytb*, 12S 和 16S)和多个核基因的序列, 分析蟒科和蚰科物种的进化关系, 认为蚰科在这3个物种中先分化出来, 而蟒科和闪鳞蛇科始终聚成姐妹群关系。单基因和线粒体基因组的系统进化分析同样得到上述研究结果(图2A, 图2B), 进一步确定了蟒科、闪鳞蛇科和蚰科三者之间的进化关系^[10]。

3.3 蛇亚目线粒体基因组的重排

线粒体基因排列次序在进化过程中较为稳定, 但在两栖类、鱼类和一些有袋类等类群中发现存在基因重复、基因重排和基因缺失等现象^[11-12]。蛇类线粒体基因组在演化过程中出现了某些基因排列顺序的变化, 如 O_L 缺失、tRNA-^{LQM} 基因簇和 tRNA-^{WANCY} 基因簇中的基因重排、控制区重复、tRNA-^L 移位和 tRNA-^P 的功能缺失等^[11], 进化程度高级的新蛇附目 *Caenophidia* 中重排更加多样^[13]。由此认为: 具有共同基因重排顺序的物种很有可能具有共同的祖先, 因为不同物种间共享的基因排列顺序, 不可能是通过趋同进化而独立产生的。

蟒科在分类上属于蛇亚目原蛇附目。结合基因结构和顺序分析, 蟒科目前已报道的3个物种和本研究所报道的网纹蟒线粒体结构均体现出真蛇类物种的线粒体基因结构类型, 存在 tRNA-^{LQM} 基因簇和 tRNA-^{WANCY} 基因簇, 并且没有发生 tRNA-^P 的假基因化现象, 存在2个控制区, 且结构基本统一。tRNA-^{LQM} 基因簇由早期真蛇类的 tRNA^{Leu} 发生移位形成。本研究发现: 除细盲蛇科物种(RH)外, 所列举的物种均含有该基因; 而 tRNA-^{WQANCY} 基因簇由 tRNA^{Gln} 移位生成, 仅存在于细盲蛇科(RH); 真蛇类 tRNA^P 假基因的出现, 则表现为控制区2附近的 tRNA^P 假基因化(OO 和 AP)和控制区1附近的 tRNA^P 缺失(RH)。双控制区在其他爬行动物^[14]、两栖类^[13]和鸟类^[15]中也有存在, 重复控制区认为可能是功能上(使得可以从多个位点启动复制和转录, 提高效率)和进化选择上的优势, 多次复制和插入形成并维持双控制区^[12]。

对控制区的聚类分析发现: 物种中独立存在的2个控制区在系统发生过程中并非按排列的位置成簇聚集, 而是在各物种间聚成一枝(图3C), 这和之前其他蛇类中描述的结果保持一致^[12]。控制区重复事件认为发生在7000万a前^[12]: 在原始类群蠕蛇附目 *Scolecophidia* 和细盲蛇科中仅存在1个控制区, 随着蛇类演化, 真蛇类线粒体中出现了控制区重复的事件, 而在此基础上基因重排演化出 tRNA 的移位和转化。但聚类结果中2个控制区并没有按照2个分布进行聚类, 主要原因则是因为在物种进化过程中发生了协同进化, 导致同个物种的2个控制区形成了较高的同源性, 相似度达100%^[12]。

4 参考文献

- [1] AULIYA M, MAUSFELD P, SCHMITZ A, *et al.* Review of the reticulated python (*Python reticulatus* Schneider, 1801) with the description of new subspecies from Indonesia [J]. *Naturwissenschaften*, 2002, **89**(5): 201 – 213.
- [2] International Union for Conservation of Nature and Natural Resource (IUCN). The IUCN red list of threatened species [J]. *J Fish Biol*, 2013, **73**(8): 2068 – 2074.
- [3] MURRAY-DICKSON G, GHAZALI M, OGDEN R, *et al.* Phylogeography of the reticulated python (*Malayopython reticulatus* ssp.): conservation implications for the worlds' most traded snake species [J]. *PLoS One*, 2017, **12**(8): e0182049.
- [4] REYNOLDS G R, NIEMILLER M L, REVELL L J. Toward a Tree-of-Life for the boas and pythons: multilocus

- species-level phylogeny with unprecedented taxon sampling [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2014, **71**(1): 201 – 213.
- [5] GREEN M R, SAMBROOK J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* [M]. 4th Ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2000.
- [6] TAUMURA K, PETERSON D, PETERSON N, *et al.* MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. *Mol Biol Evol*, 2011, **28**(10): 2731 – 2739.
- [7] KING S R B, SCHOENCKEKER K A, FIKE J A, *et al.* Long-term persistence of horse fecal DNA in the environment makes equids particularly good candidates for noninvasive sampling [J]. *Ecol Evol*, 2018, **8**(8): 4053 – 4064.
- [8] KHEDKAR T, SHARMA R, TIKNAIK A, *et al.* DNA barcoding using skin exuviate can improve identification and biodiversity studies of snakes [J]. *Mitochondrial DNA*, 2016, **27**(1): 499 – 507.
- [9] 石林春, 陈俊, 刘冬, 等. 基于 COI 条形码的中药材蛇蛻及其易混伪品的 DNA 分子鉴定[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2014(2): 284 – 287.
- SHI Linchun, CHEN Jun, LIU Dong, *et al.* Molecular identification of *Sperentis periostracum* and its adulterants based on COI sequence [J]. *World Sci Technol Modernization Tradit Chin Med*, 2014(2): 284 – 287.
- [10] FIGUEROA A, MCKELVY A D, GRISMER L L, *et al.* A species-level phylogeny of extant snakes with description of a new colubrid subfamily and genus [J]. *PLoS One*, 2016, **11**(9): e0161070. doi: 10.1371/journal.pone.0161070.
- [11] 李恩. 基于线粒体基因组的蛇亚目系统发生关系的探讨[D]. 芜湖: 安徽师范大学, 2014.
- LI En. *The Phylogenetic Relationships of Suborder Serpentes Based on the Complete Mitochondrial Genomes* [D]. Wuhu: Anhui Normal University, 2014.
- [12] JIANG Z J, CASTOE T A, AUSTIN C C, *et al.* Comparative mitochondrial genomics of snakes: extraordinary substitution rate dynamics and functionality of the duplicate control region [J]. *BMC Evol Biol*, 2007, **7**(1): 123. doi: 10.1186/1471-2148-7-123.
- [13] SANO N, KURABAYASHI A, FUJII T, *et al.* Complete nucleotide sequence of the mitochondrial genome of Schlegel's tree frog *Rhacophorus schlegelii* (family Rhacophoridae): duplicated control regions and gene rearrangements [J]. *Genes Genet Syst*, 2005, **80**(3): 213 – 224.
- [14] INOUE J G, MIYA M, TSUKAMOTO K, *et al.* Evolution of the deep-sea gulper eel mitochondrial genomes: large-scale gene rearrangements originated within the eels [J]. *Mol Biol Evol*, 2003, **20**(11): 1917 – 1924.
- [15] ABBOTT C L, DOUBLE M C, TRUEMAN J W, *et al.* An unusual source of apparent mitochondrial heteroplasmy: duplicate mitochondrial control regions in *Thalassarche albatrosses* [J]. *Mol Ecol*, 2010, **14**(11): 3605 – 3613.